

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Angefertigt am Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr in München

(PD Dr. rer. nat. Sandra Eßbauer)

Molekulare Charakterisierung der Epidemiologie von Zecken-übertragenen Enzephalitis Virus-Infektionen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Würde eines Doktor rer. biol. vet.

der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Stefan Oliver Frey

aus Rheinfelden/Baden

München 2014

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Koreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Monika Rinder

Tag der Promotion: 12. Juli 2014

Die vorliegende Arbeit wurde nach § 6 Abs. 2 der Promotionsordnung für die
Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München als kumulative
Dissertation gestaltet.

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Das Zecken-übertragene Enzephalitis Virus, Tick-borne encephalitis virus	2
1.1.	Viruscharakteristika	4
1.1.1.	Virusaufbau und Zusammenbau	4
1.1.2.	Virusgenom	5
1.1.3.	Virusproteine	5
2.	Epidemiologie der Zecken-übertragenen Enzephalitis.....	6
2.1.	Verbreitung des TBEV	6
2.2.	Übertragung des TBEV durch Zecken und infizierte Milchprodukte auf Mensch und Tier.....	10
3.	Tick-borne encephalitis (TBE) bei Menschen	12
4.	TBE bei Haus-, Nutz- und Wildtieren	13
4.1.	TBEV-Infektionen bei Haustieren	14
4.1.1.	TBEV-Infektionen bei Hunden	14
4.1.2.	TBEV-Infektionen bei Pferden	15
4.2.	TBEV-Infektionen bei Nutztieren	15
4.2.1.	TBEV-Infektionen bei Rindern	16
4.2.2.	TBEV-Infektionen bei Schafen und Ziegen	16
4.3.	TBEV-Infektionen bei Wildtieren	16
4.3.1.	TBEV-Infektionen bei Mäusen	17
4.3.2.	TBEV-Infektionen bei Vögeln	18
4.3.3.	TBEV-Infektionen bei Füchsen	18
5.	Phylogenie von TBEV	19
6.	Ziel der Doktorarbeit	20
III.	ORIGINALARBEITEN	21
1.	Publikation 1	21
2.	Publikation 2	26

3.	Publikation 3	28
4.	Publikation 4	39
5.	Publikation 5	42
IV.	DISKUSSION	55
1.	Isolierung von TBEV aus Zecken	55
2.	Typisierung und Epidemiologie von TBEV	55
2.1.	Vergleich von TBEV basierend auf Nukleotidsequenzen des E-Gens	55
2.1.1.	Vergleich von TBEV-Stämmen aus Deutschland, Österreich und der Slowakei	56
2.1.2.	Vergleich eines mongolischen TBEV mit TBEV-Stämmen aus Sibirien ..	59
2.1.3.	Vergleich eines dänischen TBEV-Stammes mit skandinavischen TBEV-Stämmen	60
2.2.	Sequenzierung von TBEV-Gesamtgenomen aus der Slowakei, Österreich und der Mongolei	62
2.2.1.	Epidemiologie von TBEV-Stämmen aus der Slowakei	62
2.2.2.	Epidemiologie eines TBEV-Stamms aus Österreich	64
2.2.3.	Epidemiologie eines TBEV-Stamms aus der Mongolei	65
V.	ZUSAMMENFASSUNG	67
VI.	SUMMARY	69
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	71
VIII.	DANKSAGUNG	87

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
C-Protein	Capsidprotein
E-Gen	Hüllgen
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
E-Protein	Hüllprotein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FSME	Frühsommer Meningoenzephalitis
FSMEV	Frühsommer Meningoenzephalitis-Virus
kD	Kilodalton
LIV	Louping ill-Virus
M-Protein	Membranprotein
NCR	nicht kodierende Region
nm	Nanometer
NS	Nichtstrukturprotein
nt	Nukleotid
RNS	Ribonukleinsäure
RSSE	Russische Frühjahr-Sommer Enzephalitis
RSSEV	Russische Frühjahr-Sommer Enzephalitis-Virus
SLEV	St.-Louis-Enzephalitis-Virus
spp.	Spezies
TBE	Tick-borne encephalitis
TBEV	Tick-borne encephalitis virus
TBEV-Eu	Tick-borne encephalitis virus, europäischer Subtyp
TBEV-FE	Tick-borne encephalitis virus, fernöstlicher Subtyp
TBEV-S	Tick-borne encephalitis virus, sibirischer Subtyp

I. EINLEITUNG

Die Frühsommer-Meningoenzephalitis (Tick-borne enzephalitis, TBE) ist in Deutschland die derzeit wichtigste, durch Arthropoden übertragene Virusinfektion. Seit Einführung der Meldepflicht für TBE im Infektionsschutzgesetz im Jahr 2001 wurden bundesweit 4169 humane Erkrankungsfälle berichtet. Dabei wurden in den letzten Jahren vor allem in den Bundesländern Baden-Württemberg, Bayern und Hessen Erkrankungsfälle beobachtet (Robert Koch-Institut: SurvStat, <http://www3.rki.de/SurvStat/>, Datenstand 05.03.2014). Über den Zeitraum von zwölf Jahren wurden zwischen 200 und bis zu 540 Erkrankungsfälle jährlich registriert. Subklinische und milde, fieberhafte Verläufe der TBE-Erkrankung führen vermutlich zu einer hohen Dunkelziffer von Infektionen, die in diesem Meldewesen nicht erfasst werden. Obwohl die TBE beim Menschen einen hohen Bekanntheitsgrad hat und viel Beachtung findet, ist das Wissen über die Erkrankung bei Tieren rudimentär. In der Literatur sind wenige Fälle über TBE bei Hunden, Pferden, Rotwild, Ziegen und anderen Säugetieren beschrieben. Die Bekanntheit der TBE-Erkrankung im Allgemeinen täuscht darüber hinweg, dass über das TBE-Virus und seine Übertragungswege oder über seine Pathogenität relativ wenig Wissen vorhanden ist. In den letzten drei Jahrzehnten wurden nur wenige TBE-Viren isoliert, charakterisiert und miteinander verglichen.

Das Ziel der Arbeit war die Isolierung von verschiedenen TBE-Viren aus verschiedenen Endemieregionen Europas und Asiens aus Zecken, sowie deren Charakterisierung. Die neuen Virusisolate sollen den Bestand an verfügbaren Virusstämmen erweitern und durch Sequenzierung subtypisiert und molekularbiologisch charakterisiert werden. Die Ergebnisse dieser molekularbiologischen Untersuchungen bilden die Voraussetzungen für weitere Analysen zum Ursprung und Herkunft, sowie zur Verbreitung der TBE-Viren. Die Virusisolate bieten außerdem die Möglichkeit von weiteren Charakterisierungen hinsichtlich Replikationsverhalten in Zellkultur und Tiermodellen, um Aussagen über deren Pathogenität zu erhalten.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Das Zecken-übertragene Enzephalitis Virus, Tick-borne encephalitis virus

Das Zecken-übertragene Enzephalitis-Virus, im internationalen Sprachgebrauch Tick-borne encephalitis virus (TBEV), gehört zur Familie der *Flaviviridae*, Genus *Flavivirus*. Dort wird es in die Säugetier-Gruppe der Zecken-übertragenen Flaviviren eingeordnet (Abbildung 1). Namensgeber für die Familie der *Flaviviridae* (flavus, lateinisch „gelb“) war das Symptom der Gelbsucht (Ikterus). Dieses Symptom ist als Kardinalssymptom des Gelbfiebers beschrieben, dessen Erreger (Gelbfieber-Virus) die Typspezies der Flaviviren bildet (Strode 1951). Flaviviren können eine Reihe von Erkrankungen verursachen, die mit Fieber, hämorrhagischem Fieber oder Enzephalitis einhergehen.

Genus *Flavivirus*

Zecken-übertragene Flaviviren

Zecken-übertragene Flaviviren, Säugetier-Gruppe

TBEV, europäischer Subtyp (TBEV-Eu)

TBEV, sibirischer Subtyp (TBEV-S)

TBEV, fernöstlicher Subtyp (TBEV-FE)

Zecken-übertragene Flaviviren, Seevogel-Gruppe

Mosquito-übertragene Flaviviren

Aroa-Virus Gruppe

Dengue-Virus Gruppe

Japan-Enzephalitis-Virus Gruppe

Kokobera-Virus Gruppe

Ntaya-Virus Gruppe

Spondweni-Virus Gruppe

Gelbfieber-Virus Gruppe

Flaviviren ohne bekannten Vektor

Genus *Pestivirus*

Genus *Hepacivirus*

Abbildung 1: Mitglieder der Familie *Flaviviridae*: Die Familie der *Flaviviridae* besteht aus den drei Genera *Flavivirus*, *Pestivirus* und *Hepacivirus*. Tick-borne encephalitis virus (TBEV) gehört zum Genus *Flavivirus*, Zecken-übertragene Flaviviren, Säugetier-Gruppe.

Die bekanntesten humanpathogenen Vertreter im Genus *Flavivirus* sind neben dem Gelbfieber Virus das Dengue Virus Typ 1-4, das Japan-Enzephalitis-Virus, das St.-Louis-Enzephalitis-Virus, das West-Nil-Virus und das TBEV, (Tabelle 1),

(Lindquist et al. 2008; Modrow et al. 2010; King et al. 2012). Viren der Tick-borne encephalitis Virus-Gruppe werden in drei verschiedene Subtypen eingeteilt (Abbildung 2). Der europäische TBEV-Subtyp (TBEV-Eu) verursacht die Frühsommer Meningoenzephalitis (FSME) und wird im deutschen Sprachraum als Frühsommer Meningoenzephalitis-Virus (FSMEV) bezeichnet. Die beiden russischen Subtypen, der sibirische Subtyp (TBEV-S) und der fernöstliche Subtyp (TBEV-FE), verursachen das Krankheitsbild der Russischen Frühjahr-Sommer Enzephalitis (RSSE) und werden daher manchmal als Russische Frühjahr-Sommer Enzephalitis-Virus (RSSEV) benannt (Abbildung 2), (Holzmann et al. 1992; Ecker et al. 1999; Hubalek et al. 2012).

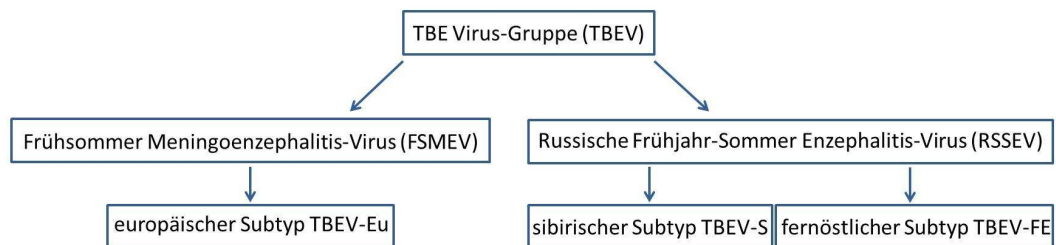


Abbildung 2: Einteilung der TBE Virus-Gruppe in europäischer, sibirischer und fernöstlicher Subtyp.

Neben den genannten humanpathogenen Erreger des Genus *Flavivirus* gibt es auch relevante tierpathogene Vertreter. Das TBEV, das Gelbfieber-Virus und das West-Nil-Virus sind Zoonose-Erreger und nach einer durchgemachten Erkrankung im Mensch und Tier durch spezifische Antikörper nachweisbar. Veterinärmedizinisch relevante Flaviviren sind das Wesselsbron-Virus und das Louping Ill-Virus, (Tabelle 1), (Modrow et al. 2010).

Als einziger der aufgeführten Erreger der Flaviviren wird das TBEV durch Zecken übertragen und deren Vertreter werden deshalb auch „TBE Virus-Gruppe“ genannt. Die anderen genannten Vertreter des Genus *Flavivirus* werden durch Stechmücken (zum Beispiel *Aedes* spp. oder *Culex* spp.) übertragen (Gould et al. 2008).

Tabelle 1: Vertreter des Genus Flavivirus (modifiziert nach Modrow et al. 2010).

Humanpathogene Vertreter des Genus Flavivirus	Übertragender Vektor
Gelbfieber-Virus	<i>Aedes spp.</i>
Japan-Enzephalitis-Virus	<i>Culex spp.</i>
Dengue-Virus	<i>Aedes spp.</i>
West-Nil-Virus	<i>Aedes spp.</i> oder <i>Culex spp.</i>
St. Louis-Enzephalitis-Virus	<i>Culex spp.</i>
TBE Virus-Gruppe	<i>Ixodes spp.</i> oder <i>Dermacentor spp.</i>
Tierpathogene Vertreter Genus Flavivirus	Übertragung
Gelbfieber-Virus	<i>Aedes spp.</i>
Wesselsbron-Virus	<i>Aedes spp.</i>
West-Nil-Virus	<i>Aedes spp.</i> oder <i>Culex spp.</i>
Louping Ill-Virus	<i>Ixodes spp.</i>
TBE Virus-Gruppe	<i>Ixodes spp.</i> oder <i>Dermacentor spp.</i>

1.1. Viruscharakteristika

1.1.1. Virusaufbau und Zusammenbau

Der Durchmesser eines TBE-Virions beträgt etwa 50 nm (Murphy 1980). Die Bausteine des Virus sind die Strukturproteine, namentlich dem Capsid-Protein (C-Protein), Membran-Protein (M-Protein) und dem glykosylierten Hüll-Protein (E-Protein) (Abbildung 3a und 3b), (Rice et al. 1985). Das Virusgenom ist im Inneren des sphärischen Capsids assoziiert, welches aus den basischen C-Proteinen gebildet wird. Dieses wird von der Hüllmembran umgeben, in welche die beiden Oberflächenproteine (E-, M-Protein) als Dimer eingebettet sind. Das kleine Oberflächenprotein, das M-Protein, hat ein Molekulargewicht von 7-8 kD und das vergleichsweise deutlich größere E-Protein liegt mit einem Molekulargewicht von 51-60 kD vor (Modrow et al. 2003; Knipe et al. 2007).

Beim Zusammenbau des Virus in der Zelle lagert sich das Capsid mit dem darin assoziierten Virusgenom an der cytoplasmatischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums (ER) an, in die zuvor die viralen Membranproteine (M-Protein, E-Protein) eingebettet wurden (Kiermayr et al. 2004). Durch das darauf folgende Budding wird die ER-Membran mit den viralen Membranproteinen so weit in das Innere des ER eingestülpt, bis das Capsid vollständig von der Membran umschlossen wird. Das neu gebildete Virus wird in das Lumen des ER abgeschnürt und über den sekretorischen Weg aus der Zelle ausgeschleust (Murphy 1980; Knipe et al. 2007).

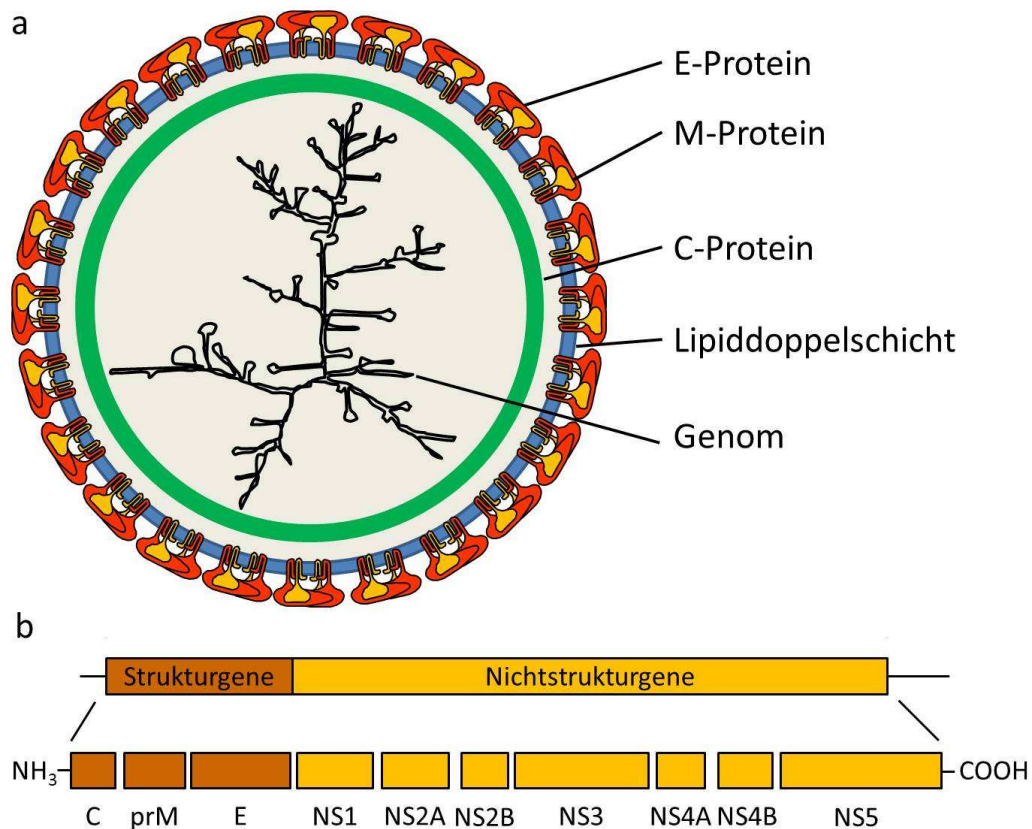


Abbildung 3: a) Querschnitt und Aufbau eines Flavivirus: In die Lipiddoppelschicht (blau) sind die Membranproteine E (rot) und M (orange) eingebettet. Im Inneren der Virushülle befindet sich das Nukleocapsid, bestehend aus C-Protein (grün). Das Genom im Inneren des Capsids bildet eine ausgeprägte Sekundärstruktur (Frey et al. unpublizierte Daten). b) Graphische Darstellung eines typischen kodierenden Bereichs eines TBEV-Genoms. Die Gesamtlänge des Genoms beträgt etwa 11100 Nukleotide und codiert für etwa 3400 Aminosäuren. Übergeordnet ist eine Aufteilung des Genoms in Strukturgene und Nichtstrukturgene dargestellt. Darunter wird die Anordnung der einzelnen Genomabschnitte gezeigt (angelehnt an Knipe et al. 2007).

1.1.2. Virusgenom

Das Virusgenom des TBEV besteht aus einer einzelsträngigen RNS in Plusstrangorientierung. Der kodierende Bereich des Genoms wird an seinen 5'- und 3'-Enden von einer nicht kodierenden Region (NCR) umgeben. Das 5'-Ende liegt in einer zweidimensionalen Struktur mit einer Cap-Struktur vor (Wengler et al. 1978; Cleaves et al. 1979; Brinton et al. 1988). Durch die komplementäre Anlagerung des 3'-Ende an das 5'-Ende bilden beide Enden eine sogenannte „Pfannenstiel“-Struktur, wodurch ein zirkuläres Genom mit einer ausgeprägten Sekundärstruktur entsteht (Abbildung 3a) (Kofler et al. 2006; Rouha et al. 2011).

1.1.3. Virusproteine

Nach der Translation des Virusgenoms liegen die Proteine zuerst als Polyprotein vor, welches im weiteren Verlauf des Replikationszyklus in einzelne Proteine gespalten wird (Abbildung 3b), (Lindenbach et al. 2003; Bollati et al. 2010). Die

Proteine werden in Struktur- und Nichtstrukturproteine unterteilt (Abbildung 3b). Während die Strukturproteine die Hülle und „Struktur“ des Virus bilden, können einigen Nichtstrukturproteinen Funktionen zugewiesen werden, die in Tabelle 2 dargestellt sind. Die Nichtstrukturproteine (NS) sind das NS1-, das NS2a-, NS2b-, NS3-, NS4a-, NS4b- und das NS5-Protein (Rice et al. 1985; Chambers et al. 1990; Heinz et al. 1993).

Tabelle 2: Funktionen der TBEV-Proteine (modifiziert nach Modrow et al. 2010).

Protein	Nukleotide (~ Länge)	Aminosäuren (~ Länge)	Funktion
5'-NCR	132	nicht kodiert	-
C	336	112	stark basisch, Wechselwirkung mit dem Virusgenom
prM	504	168	Membranprotein
E	1488	496	Membranprotein
NS1	1056	352	zellmembranassoziiert, kein Bestandteil der Viruspartikel
NS2a	690	230	nicht bekannt
NS2b	393	131	Zn ²⁺ -Metalloproteinase, assoziiert an NS3-Protease
NS3	1863	621	Helicase, Serinprotease
NS4a	447	149	nicht bekannt
NS4b	756	252	nicht bekannt
NS5	2712	904	RNS-abhängige RNS-Polymerase, RNS-Capping
3'-NCR	764	nicht kodiert	-

2. Epidemiologie der Zecken-übertragenen Enzephalitis

2.1. Verbreitung des TBEV

Die Verbreitung der Viren der TBEV-Gruppe reicht von der russischen Pazifikküste über China, Mongolei, Kasachstan, über den Balkan bis nach West- und Nordeuropa (Hubálek et al. 2012), (Abbildung 4). Das Powassan-Virus kommt als einziges Virus der TBE Virus-Gruppe in Nordamerika vor (Heinze et al. 2012). In den Endemiegebieten von TBEV findet eine unterschiedliche Dokumentation der TBE-Erkrankungen oder auch der Erforschung der Virusstämme statt. In einigen Ländern wie Österreich, Deutschland, in der Tschechischen Republik, Russland, Estland oder Finnland werden Krankheitsfälle registriert und endemische Regionen sind gut dokumentiert. In anderen Ländern, wie zum Beispiel Dänemark, Litauen, Slowakei, Kasachstan oder Mongolei, in denen TBEV auch endemisch ist, sind aufgrund selten auftretender Krankheitsfälle, einem erst im Aufbau befindlichen Gesundheitssystem oder aus

politischen Gründen nur wenige Informationen über den Erreger und dessen Vorkommen bekannt (Donoso Mantke et al. 2011). Natürliche Vektoren von TBEV sind Schildzecken (*Ixodidae*), wie *Ixodes spp.*, *Haemaphysalis spp.* oder *Dermacentor spp.*. Die Übertragung des TBEV erfolgt in Westeuropa überwiegend durch *Ixodes ricinus* (Gemeiner Holzbock) (Reháček 1962), in Russland und im Baltikum, wie im sibirischen Teil Russlands und in fernöstlichen Regionen vor allem durch die Taigazecke *Ixodes persulcatus* (Chunikhin 1990), (Abbildung 4).

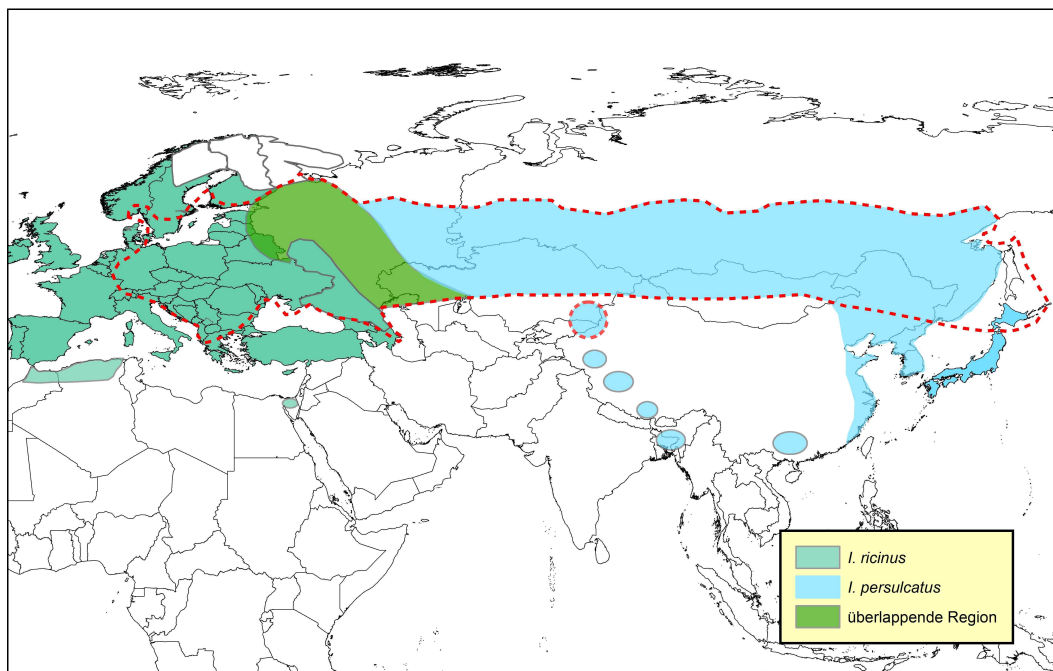


Abbildung 4: Geographische Verteilung der Vektoren *Ixodes ricinus* und *Ixodes persulcatus*. In der grün markierten Region kommen beide Vektoren vor. Die rot gepunktete Linie umrandet die europäischen und asiatischen Gebiete, in denen TBEV endemisch ist (Abbildung angelehnt an Lindquist et al. 2008).

Viren der TBE Virus-Gruppe sind in den Zeckenpopulationen nicht gleichmäßig verteilt, sondern kommen nur in endemischen Gebieten in kleinen Naturherden vor (sogenannte Foci) (Süss et al. 1992; Dobler et al. 2011). In den Naturherden können unterschiedliche Infektionsraten der Zecken vorliegen, von 0,5% bei Larven bis 5% und mehr bei adulten Zecken (Gresikova 1972; Süss et al. 2006; Klaus et al. 2010; Dobler et al. 2011).

In Deutschland ist die überwiegende Anzahl von Endemiegebieten mit den meisten FSME-Erkrankungen im Süden des Landes zu finden (Abbildung 5).

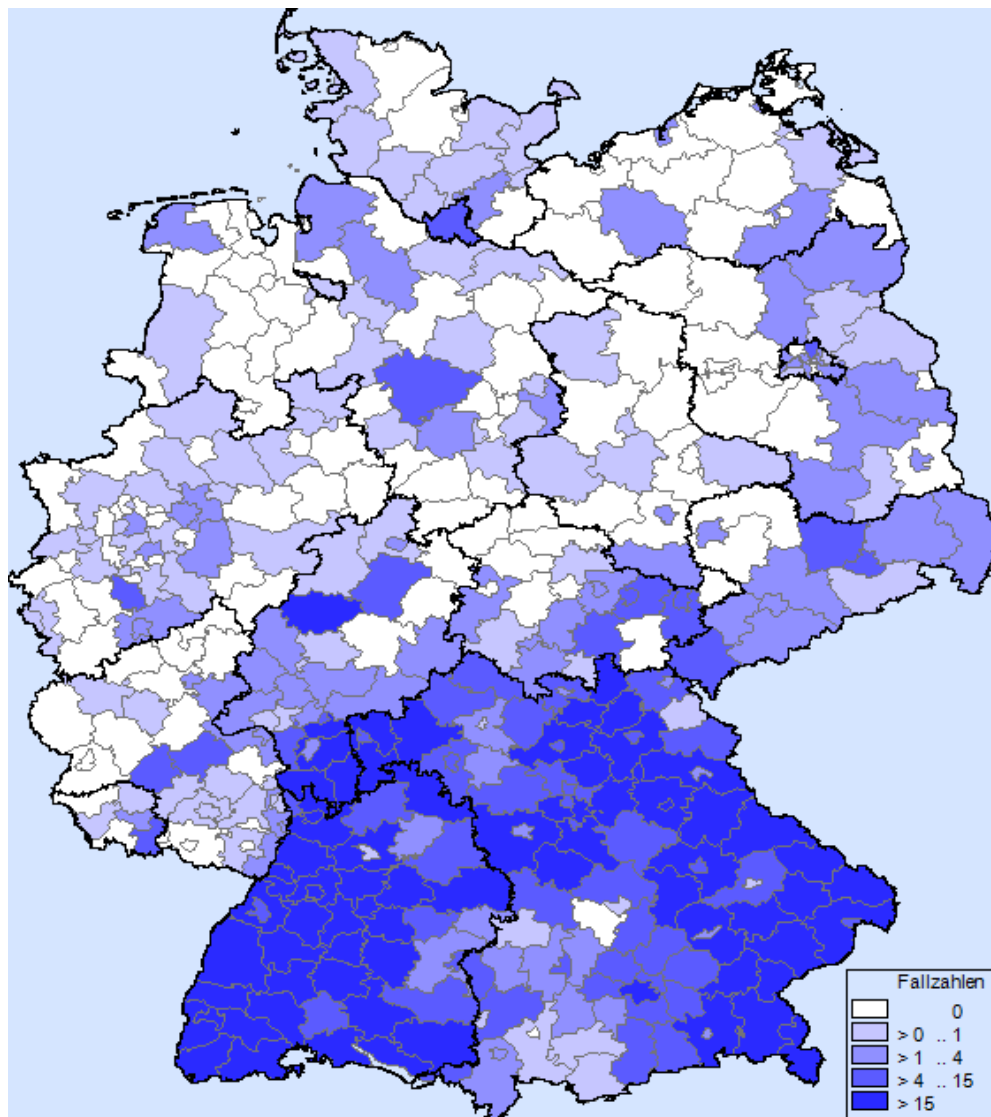


Abbildung 5: Karte aller FSME-Fälle in Deutschland seit 1991, dargestellt auf Landkreisebene. Eine Konzentration von FSME-Fällen ist im Westen Baden-Württembergs sowie im Osten und Nordosten Bayerns auszumachen. Datenstand: 05.03.2014, Quelle: <http://www3.rki.de/SurvStat/>.

Seit der Einführung der Meldepflicht für FSME in Deutschland wurden bundesweit 4169 humane Erkrankungsfälle mit klinischer Symptomatik berichtet (Robert Koch-Institut: SurvStat, <http://www3.rki.de/SurvStat/>, Datenstand 05.03.2014). Betroffen sind dabei hauptsächlich die Bundesländer Baden-Württemberg, Bayern und Hessen (Abbildung 5). Die Zahl der klinisch manifestierten Erkrankungsfälle schwankt von Jahr zu Jahr um mehr als das Zweifache. So wurden die höchsten FSME-Zahlen in den Jahren 2005 (432 Fälle), 2006 (546 Fälle), 2011 (424 Fälle) und 2013 (416 Fälle) registriert. Die niedrigsten Erkrankungszahlen stammen aus den Jahren 2002 (239 Fälle), 2007 (239 Fälle) und 2012 (195 Fälle), (Robert Koch-Institut: SurvStat, <http://www3.rki.de/SurvStat/>, Datenstand 05.03.2014). Über die Jahre hinweg war

zu beobachten, dass die Anzahl der endemischen Landkreise im Süden Deutschlands zwar langsam, aber stetig zunimmt (Robert Koch-Institut 2013). Zwischen den 1960er und 1980er Jahren war insbesondere im Osten Deutschlands das FSMEV endemisch. Bis heute persistiert es vermutlich in unentdeckten Naturherden weiter (Süss 2003; Süss 2004; Frimmel et al. 2010; Robert Koch-Institut 2013).

In Österreich ist, wie auch in Deutschland, eine starke Schwankung der FSME-Erkrankungsfälle zu beobachten. So sind im Jahr 2011 die hospitalisierten FSME-Fälle (113) deutlich zum Vorjahr 2010 (63) gestiegen, aber im Jahr 2012 wieder gefallen (52) (Virusepidemiologische Information, www.virologie.meduniwien.ac.at). Zwischen 1972 und 2011 wurden in Österreich in nicht geimpften Bevölkerungsanteilen 8.493 Fälle von TBE mit klinischer Symptomatik dokumentiert, was eine Inzidenz von sechs TBE-Fällen pro 100.000 Einwohner bedeutet. Zwischenzeitlich sind mehr als 85% der österreichischen Bevölkerung gegen TBEV geimpft, was zu einer Senkung der Inzidenz auf 0,9 TBE-Fälle pro 100.000 Einwohner führte. Diese Zahlen zeigen, dass eine massive Durchimpfung der Bevölkerung zu einer deutlichen Senkung der TBE-Neuerkrankungen führt und das durch alle Altersschichten (Heinz et al. 2013). Tendenziell nehmen derzeit in Österreich jedoch die FSME-Fälle in westlichen und südlichen Bundesländern deutlich zu (Virusepidemiologische Information, www.virologie.meduniwien.ac.at).

Im Vergleich zu Österreich und Deutschland hat Dänemark kein landesweites Meldesystem für FSME-Fälle. FSMEV wurde in Dänemark zum ersten Mal 1963 auf der Insel Bornholm in der Baltischen See entdeckt (Freundt 1963). Daten über FSMEV in Dänemark wurden in Publikationen zu Mikrofoci (Lindgren et al. 2000) und zu sero-epidemiologischen Studien von Hunden und Rehen veröffentlicht (Skarphedinsson et al. 2005; Lindhe et al. 2009).

In der Mongolei ist TBEV seit den 1980er Jahren bekannt und seit dem Jahr 2005 wurden TBE-Erkrankungen im staatlichen Meldewesen erfasst. Seither wurden jedes Jahr etwa 20 TBE-Fälle registriert (Khasnatinov et al. 2010). Eine seroepidemiologische Studie aus verschiedenen Provinzen des Landes zeigte, dass TBE-Erkrankungen hauptsächlich im Norden des Landes vorkommen (Walder et al. 2006).

Erste Berichte über TBE in der Slowakei stammen aus den späten 1940er und zu Beginn der 1950er Jahre. Diese zählen zu den ersten Beschreibungen der TBE in Europa überhaupt (Blaskovic 1949; Libikova 1952). Im Jahr 2009 wurden in der Slowakei 70 TBE-Erkrankungen registriert. Die Inzidenz von TBE-Erkrankungen in der Slowakei liegt damit bei 1,3 TBE-Fälle bezogen auf 100.000 Personen und variiert signifikant in unterschiedlichen Regionen (Donoso Mantke et al. 2011). Etwa 5% der jährlich gemeldeten TBE-Erkrankungen werden durch den Verzehr von Rohmilchprodukten verursacht (Labuda et al. 2002; Pazidora et al. 2008). Die ersten Studien, die in der Slowakei zu TBEV durchgeführt wurden, bezogen sich auf die Aufklärung fokaler Aktivitäten des Virus und auf durch Ziegen- und Kuhmilch übertragene TBEV-Infektionen (Bardos et al. 1954; Gresikova 1958; Gresikova et al. 1959; Nosek et al. 1962). Aus dieser Zeit stammt der frühere Name der Erkrankung, die „Undulierendes MilCHFieber“ genannt wurde.

2.2. Übertragung des TBEV durch Zecken und infizierte Milchprodukte auf Mensch und Tier

Die Übertragung von Viren der TBE Virus-Gruppe innerhalb der Zeckenpopulation kann transovariell durch Übertragung des Virus von infizierten Weibchen über die Eier auf die nächste Generation oder sexuell durch die Übertragung zwischen männlichen und weiblichen Zecken untereinander geschehen (Danielova et al. 2002). Die TBEV-Übertragung innerhalb der Zeckenpopulation kommt jedoch noch öfter durch die transstadiale Übertragung vor. Ist eine Zecke infiziert und befindet sie sich im Larven- oder im Nymphenstadium, kann das Virus transstadial in das nächste Zeckenstadium persistieren (Abbildung 7), (Nuttal et al. 2003). Das TBEV vermehrt sich in den Speicheldrüsen der Zecken und wird durch den „Zeckenstich“ auf den Vertebraten übertragen (Labuda et al. 1993a). Nach dem Zeckenstich findet der Saugvorgang statt, bei dem über die Speicheldrüse infizierter Speichel über die eingesenkte Nahrungsrinne des Hypostoms (Stechrüssel) in die Wunde des Vertebraten abgegeben wird (Abbildung 6), (Satz 2006).

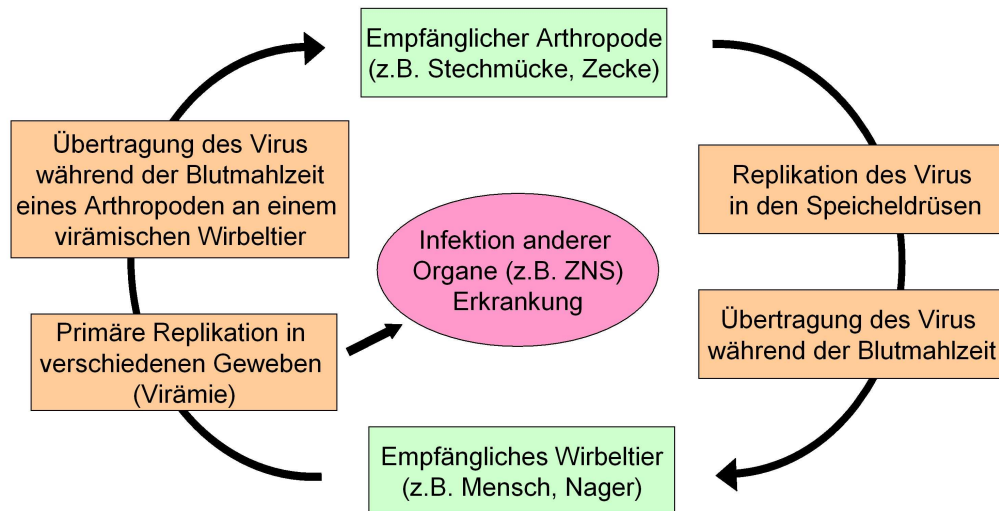


Abbildung 6: Arbovirus-Zyklus; graphische Darstellung einer möglichen Übertragung des Virus von einem Arthropoden auf einen Vertebraten. Die Virusverbreitung unter den Arthropoden kann durch transovariable Übertragung, Kopulation oder „Co-feeding“ stattfinden. Eine Übertragung unter den Wirbeltieren kann durch Milch, Muttermilch, durch Kontakt mit infektiösem Blut oder aerogen stattfinden (angelehnt an H. Aspöck et al. 2010).

Als natürliche Wirtsorganismen zur Aufrechterhaltung des Übertragungszyklus des Virus innerhalb eines Naturherds spielen vor allem kleinere Säugetiere eine wichtige Rolle (Abbildung 7), (Kozuch et al. 1966, 1967a, 1967b; Kiffner et al. 2011).

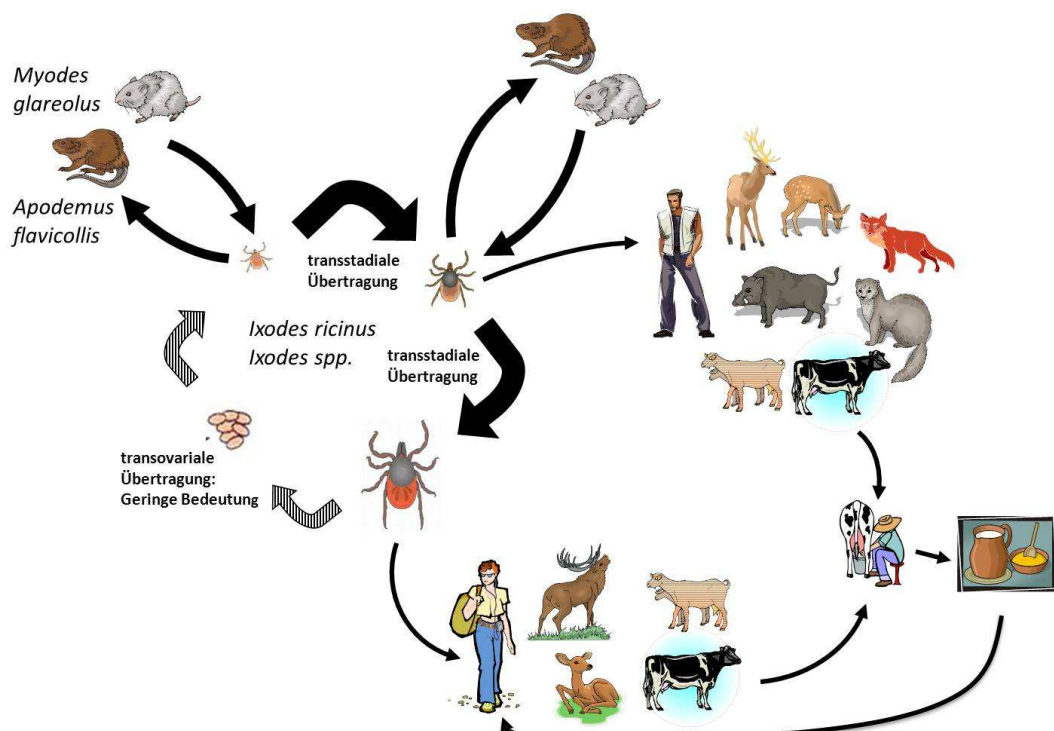


Abbildung 7: Natürlicher Übertragungszyklus des TBEV. Das TBEV kann innerhalb der Zeckenpopulation (*Ixodes spp.*) durch transstadiale oder transovarische Übertragung zirkulieren. Kleine Säugetiere sind natürliche Wirtsorganismen des TBEV, während größere Säugetiere als Wirt eine geringere Rolle spielen. Das TBEV kann auch über infizierte Milchprodukte übertragen werden (angelehnt an Aspöck et al. 2010).

Die Vertebraten, die mit dem Virus infiziert sind, geben das Virus über das Blut an eine saugende Zecke weiter oder die Übertragung erfolgt durch sogenanntes „Co-feeding“. Hierbei saugt eine infizierte Zecke an einem nicht infizierten Vertebraten Blut. Die infizierte Zecke gibt direkt über Lymphe oder über einwandernde Makrophagen das Virus an eine andere, in nächster Nähe saugende, nicht-infizierte Zecke weiter, ohne dass dadurch eine Virämie oder immunologische Antwort des Vertebraten nachweisbar wäre (Labuda et al. 1993b; Labuda et al. 1996; Labuda et al. 1999; Randolph et al. 2011).

Eine Übertragung von TBEV durch Milchprodukte von Kühen oder Ziegen ist in Ländern wie Polen, Slowakei oder Österreich, in denen gerne rohe Milchprodukte verzehrt werden, mehrfach dokumentiert. Dies kann durch den Genuss von infizierten Rohmilchprodukten wie nicht-pasteurisierter Milch oder Käse geschehen (Abbildung 7), (Gresikova et al. 1959; Holzmann et al. 2009; Cisak et al. 2010; Hudopisk et al. 2013).

3. Tick-borne encephalitis (TBE) bei Menschen

Nach dem Zeckenstich infiziert das TBEV die Epithelzellen der Epidermis und Makrophagen und vermehrt sich dort (Labuda et al. 1996). Nach einer ersten Replikation verbreitet sich das TBEV über die Lymphe und das lymphatische System zu den nächstgelegenen Lymphknoten. Dort vermehrt sich das TBEV weiter und führt zur sogenannten primären Virämie, wobei die genauen Zielzellen noch nicht abschließend identifiziert sind. Über das virämische Blut werden das reticulohistiocytäre System und auch Makrophagen infiziert. Die darin erfolgende Replikation führt zu einer sekundären Virämie. Infizierten Makrophagen scheinen die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, in das zentrale Nervensystem einzuwandern und dort die Infektion der neuronalen Zellen zu vermitteln (Modrow 2003; Gelpi et al. 2005). Der Schweregrad einer TBE-Infektion scheint von verschiedenen Faktoren wie der Pathogenität eines Virusstamms, der Infektionsdosis des TBEV, individuellen Faktoren wie dem Alter des Patienten oder des individuellen Immunstatus abzuhängen (Korenberg et al. 1999). Bei

Kindern manifestiert sich die TBE meist als Meningitis, während sich bei älteren Menschen häufiger eine schwere Meningoenzephalomyelitis mit neurologischen Spätschäden ausbildet oder sogar tödlich verläuft (Tomazic et al. 1996; Kaiser 1999; Lesnicar et al. 2003; Dobler 2010). Etwa 30-50% aller infizierten Personen entwickeln nach der Inkubationszeit von 7 bis 14 Tagen Symptome eines grippalen Infekts (Grinschgl et al. 1955; Dobler 2010). Bei etwa einem Drittel dieser erkrankten Patienten entwickelt sich eine ZNS-Symptomatik (Kunz 1992). Diese kann sich in etwa 60% aller Fälle als Meningitis, in 30% aller Fälle als Meningoenzephalitis und in etwa 10% aller Fälle als Meningoenzephalomyelitis manifestieren (Kaiser et al. 2000). Die Letalitätsrate in Westeuropa ist geringer als 1% der Erkrankungen (Charrel et al. 2004; Lindquist et al. 2008). Weitere Zielzellen für das TBEV im zentralen Nervensystem sind die vorderen motorischen Rückenmarkszellen. Eine Infektion dieses Bereichs führt zu Lähmungserscheinungen, die sehr oft als Spätfolgen einer TBEV-Infektion zurückbleiben (Kaiser 1996).

4. TBE bei Haus-, Nutz- und Wildtieren

Neben dem Menschen werden auch Tiere mit TBEV infiziert. Es gibt einen natürlichen Infektionskreislauf zwischen Zecken und Wildtieren wie Mäusen, die eine ständige Zirkulation von TBEV aufrechterhalten (Abbildung 7), (Charrel et al. 2004). Verschiedene Waldmaus-Arten (*Apodemus* sp.) wurden als wichtige Wirte und als Reservoir für das Virus in diesem Kreislauf erkannt (Hubálek et al. 2012), während größere Tiere wie Ziegen, Pferde, Rinder, Schafe oder Ziegen nicht essentiell als natürliche TBEV-Reservoirs für Zecken zu sehen sind (Tabelle 3). Sie sind in der Regel Fehlwirte und stellen für das Virus und seine weitere Verbreitung eine Sackgasse dar (Abbildung 7), (Labuda et al. 2002). Serologische und epidemiologische Studien an Rindern, Rehen oder Füchsen, deren natürlicher Aktionsradius überschaubar ist, zeigen, dass diese Tierarten gute Indikatoren für das Vorkommen von TBEV-Microfoci in deren näheren Umfeld sind (Gerth et al. 1995; Rieger et al. 1999; Titenko et al. 2002; Gritsun et al. 2003). Solche Seroprävalenzstudien haben allerdings eine begrenzte Aussagekraft, da mit den Ergebnissen nur ausgesagt wird, dass die Tiere mit dem TBEV aufgrund von durchseuchter Zeckenpopulationen Kontakt hatten und damit retrospektiv zu betrachten sind (Satz 2006). Sie geben keine Information über den Zeitpunkt und die Schwere der stattgefundenen Infektion und auch nicht über die Eigenschaften

des Virus.

Tabelle 3: Wirtsspektrum von TBEV

Vektoren	Amplifikationswirte	Mögliche Amplifikationswirte	Sackgassenwirte
<i>Ixodes ricinus</i> (Gemeiner Holzbock)	<i>Apodemus flavicollis</i> (Gelbhalsmaus)	<i>Erinaceus europaeus</i> (Europäischer Igel)	<i>Cervus elaphus</i> (Rothirsch)
<i>Ixodes persulcatus</i> (Taigazecke)	<i>Apodemus sylvaticus</i> (Waldmaus)	<i>Talpa europaea</i> (Europäischer Maulwurf)	<i>Capreolus capreolus</i> (Europäisches Reh)
<i>Ixodes hexagonus</i> (Igelzecke)	<i>Apodemus agrarius</i> (Brandmaus)	<i>Sorex araneus</i> (Waldspitzmaus)	<i>Capreolus pygargus</i> (Sibirisches Reh)
<i>Dermacentor marginatus</i> (Schafzecke)	<i>Myodes glareolus</i> (Röteldmaus)		<i>Sus scrofa</i> (Wildschwein)
<i>Dermacentor reticulatus</i> (Auwaldzecke)			<i>Capra aegagrus hircus</i> (Hausziege)
<i>Haemaphysalis spp.</i>			<i>Bos primigenius taurus</i> (Hausrind)
			<i>Equus ferus caballus</i> (Hauspferd)
			<i>Canis lupus familiaris</i> (Haushund)
			<i>Homo sapiens</i> (Mensch)

4.1. TBEV-Infektionen bei Haustieren

4.1.1. TBEV-Infektionen bei Hunden

TBEV-Infektionen bei Hunden wurden bisher vor allem in Deutschland, der Schweiz und Österreich beschrieben (Tipold et al. 1993; Müller 1997; Weissenböck et al. 1997; Bröker et al. 2003; Randolph, 2004). Hunde sind aufgrund ihrer Körpergröße und aufgrund ihres Verhaltens einem 50 bis 100-fach höheren Infektionsrisiko ausgesetzt. (Pfeffer et al. 2011). Hunde zeigen in der Mehrzahl aller, durch Laboruntersuchungen bestätigten TBEV-Infektion nur selten Symptome oder zeigen unspezifische Anzeichen, die für eine TBEV-Infektion nicht typisch sind (Weissenböck et al. 1998). Im Fall einer symptomatischen Infektion ist der Krankheitsverlauf oft sehr schwer und mit einer hohen Mortalität behaftet. Praktisch immer treten erhöhte Körpertemperaturen und Verhaltensänderungen auf. Daneben wurden motorische Ausfälle der Vorder- oder Hinterläufe mit verminderten Reflexen und verminderter Propriozeption beobachtet (Wandler et al. 1972; Reiner et al. 1998; Kritz et al. 2001). Im weiteren Krankheitsverlauf werden neurologische Funktionsstörungen des

Cerebrum und des Hirnstamm beschrieben. Bei einer post mortem Studie an acht Gehirnen von an TBE verendeten Hunden aus Österreich wurden Anzeichen von Meningitis, umfassende neuronale Nekrosen, Kernfragmentierungen von Gliazellen und eine erhebliche Microgliosis festgestellt. Im Kleinhirn waren ein Schwund von Purkinje-Zellen und eine starke Zunahme von Mikroglia-Zellen zu beobachten. Alle Hirnregionen zeigten perivaskuläre Infiltrate, bestehend aus Lymphocyten, Makrophagen, Plasmazellen und roten Blutkörperchen. Die meisten Veränderungen wurden im Neuroparenchym und der Umgebung des vierten Ventrikels beobachtet, die aus Läsionen verschiedenster Ausprägung bestanden (Weissenböck et al. 1998). Die Pathogenese einer TBEV-Infektion bei Hunden wird vergleichbar der des Menschen oder experimentell infizierten Mäusen beschrieben (Denk et al. 1966; Doherty et al. 1972; Környey 1978; Jellinger 1979; Weissenböck et al. 1998).

4.1.2. TBEV-Infektionen bei Pferden

Pferde weisen, ähnlich Hunden, ein akutes Infektionsrisiko für TBEV-Infektionen auf. Das Grasens auf der Weide stellt ein Risiko für eine Infektion durch Zeckenstich dar. Bei Pferden sind jedoch nur wenige Daten über TBEV-Infektionen vorhanden. Serologische Studien aus Österreich und Deutschland zeigen, dass seropositive Pferde, mit einem TBEV-Endemiegebiet in Verbindung gebracht werden können (Rushton et al. 2013). Umgekehrt waren Pferde in Nicht-Endemiegebieten serologisch TBEV-negativ (Klaus et al. 2013). Eine TBE kann beim Pferd asymptomatisch als auch symptomatisch ablaufen (Luckschander et al. 1999; Müller et al. 2006; Klaus et al. 2013; Rushton et al. 2013). TBE-Infektionen bei Pferden weisen unspezifische Krankheitszeichen, reduziertes Gewicht, reduzierten Appetit, Nervosität, Ängstlichkeit, Aufbäumen und unerwartetes Verhalten auf (Waldvogel et al. 1981; Klaus et al. 2013). Bei Pferden wiederum scheint sich nach einer symptomatischen Erkrankung in der Regel vollständige Genesung einzustellen. Es sind jedoch auch leichte bleibende Residuen beschrieben (Klaus et al. 2013).

4.2. TBEV-Infektionen bei Nutztieren

Eine akute TBE-Infektion scheint bei Ziegen, Schafen, Rindern oder Schweinen zu keinerlei Symptomatik zu führen. Dies zeigte sich auch bei seropositiven Tieren. Ziegen oder Schafe, durch deren Milch Menschen infiziert wurden,

zeigten keine Symptome während der virämischen Infektionsphase (Van Tongeren 1955; Gresikova et al. 1959; Zindl et al. 1983; Balogh et al. 2012). Grundsätzlich scheiden Wiederkäuer während der virämischen Phase das TBEV in der Milch aus. Die ausgeschiedene Virusmenge ist für die orale Infektion des Menschen ausreichend („undulierendes MilCHFieber“). Nach der Fütterung mit TBEV-haltiger Milch einer Ziege wurde ein Hausschwein TBEV-positiv getestet, allerdings zeigte das Schwein keinen symptomatischen Verlauf. (Holzmann et al. 2009).

4.2.1. TBEV-Infektionen bei Rindern

TBEV-Infektionen bei Rindern wurden bisher nur selten beschrieben. In einer Studie aus den 1950er Jahren konnte bei einem mit TBEV subkutan infiziertem Rind am dritten und vierten Tag nach der Infektion TBEV aus der Milch isoliert werden. Aus dem Blut konnte das Virus bereits nach zwei Tagen isoliert werden. Das Tier zeigte während des Versuchs keine klinischen Krankheitssymptome (Gresikova et al. 1959). Ergebnisse von Seroprävalenzstudien an 239 Rindern in Sibirien zeigten eine gute Übereinstimmung der Prävalenzraten mit TBEV-Risikogebieten. Für Gebiete mit einer hohen Aktivität von TBEV in Naturherden konnte ein hoher Prozentsatz positiver Serumproben nachgewiesen werden und für Gebiete mit geringer Aktivität grenzwertige, oder negative Serumproben (Titenko et al. 2002). In einer Studie aus Polen aus dem Jahr 2010 wurde von 63 Rindern Milch mittels RT-PCR getestet. Dabei konnte in 11,1% der getesteten Rindern TBEV nachgewiesen werden. (Cisak et al. 2010).

4.2.2. TBEV-Infektionen bei Schafen und Ziegen

Im Jahr 1999 erkrankten in Tschechien 21 Personen durch Verzehr traditionell hergestellten Schafskäses an einer TBE. Eine Seroprävalenz-Testung von 41 Schafen ergab, dass 32% der Serumproben TBEV-reaktiv waren (Zeman et al. 2004). Ziegen, die akut an einer TBE erkrankt sind, scheinen in der virämischen Phase keine Symptome zu zeigen. Oft wird man bei einer Ziege erst dann auf die TBE-Infektion aufmerksam, wenn durch ihre virämische Milch ein Mensch infiziert wurde (Holzmann et al. 2008; Balogh et al. 2010).

4.3. TBEV-Infektionen bei Wildtieren

Bislang gibt es für Wildtiere keine Untersuchungen, bei denen über eine klinische Symptomatik bei TBEV-Infektionen berichtet wurde. In Kroatien wurden bei

einer serologischen Studie verschiedene Wildtiere getestet. Im Rahmen einer Seroprävalenz-Studie von Rothirschen, Rehen und Wildschweinen zeigten die Rehe eine Seroprävalenzrate von 64% (n=37), die Wildschweine von 43% (n=81) und die Rothirsche von 38% (n=102) (Borcic et al. 2010). Im Rahmen einer serologischen Studie aus der Tschechischen Republik, die im Zeitraum von 1986 bis 1991 durchgeführt wurde, wurden 33 Rehe, 22 Rothirsche und 34 Wildschweine untersucht. Auch hier lag mit 21% die höchste Seroprävalenz bei Rehen, Rothirsche wiesen eine Seroprävalenzrate von 9% auf und die Wildschweine zeigten eine Seroprävalenz von 6% (Hubalek et al. 1993). In einer serologischen Studie im Südwesten Deutschlands wurden auf einer Fläche von 519 km² während der Jagdzeit von 1986/87 192 Serumproben von erlegten Rehen genommen. 47 (24,5%) der Proben wurden im Hämagglutinationshemmtest und im ELISA TBEV-positiv getestet. Die Werte wurden mit humanen TBE-Infektionen aus der Region verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass in Arealen mit hohen Seroprävalenz-Werten bei Rehen auch humane TBE-Fälle auftraten. Die Autoren schließen aus dieser Studie, dass Gebiete mit hohen Seroprävalenzraten in Rehen Risikoareale für den Menschen darstellen an TBE zu erkranken und damit ein guter Indikator für TBE-Infektionsgebiete sind (Gerth et al. 1995). In einer computergestützten Studie aus Slowenien konnte die Dichte des Rotwildbestandes mit dem Vorkommen von humanen TBE-Fällen in Verbindung gebracht werden. Gebiete mit einer hohen Inzidenz an TBE wiesen eine hohe Rotwild-Dichte auf und eine geringe Dichte des Rotwildbestandes korrelierte mit einer niedrigen TBE-Rate. Für Rehe konnte in dieser Studie keinen messbaren Effekt auf die TBE-Inzidenz festgestellt werden, weil die Anzahl an Rehen in Slowenien einen messbaren Schwellenwert überschreitet, sodass kein Effekt auf die TBE-Inzidenz auszumachen ist (Knap et al. 2012).

4.3.1. TBEV-Infektionen bei Mäusen

Mäuse spielen im natürlichen Übertragungszyklus des TBEV zwischen Zecken und Wildtieren eine entscheidende Rolle (Randolph et al. 1999; Charrel et al. 2004; Satz 2006). Innerhalb dieses Zyklus werden verschiedene Waldmaus-Arten (*Apodemus* spp.) als die wichtigsten Wirte angesehen (Labuda et al. 1999; Hubálek et al. 2012). Mäuse werden von sehr vielen Zecken, vor allem im Larven- und Nymphenstadium, gleichzeitig befallen. Sie können über die Aufnahme virämischen Blutes oder des Cofeeding das Virus von einer Zecke

aufnehmen und nach der extrinsischen Inkubationszeit auf andere Wirbeltiere übertragen (Labuda et al. 1993b; Labuda et al. 1996). Es gibt Hinweise, dass Gelbhalsmäuse (*Apodemus flavicollis*) und Waldmäuse (*Apodemus sylvestris*) mit TBEV persistent infiziert werden können. Solch eine persistierende TBE-Infektion zeigt bei den Tieren keine klinische Symptomatik (Achazi et al. 2011). Eine Studie aus Finnland beschreibt, dass TBEV während der Wintermonate in *Microtus agrestis* und in *Myodes glareolus* persistiert (Tonteri et al. 2011).

4.3.2. TBEV-Infektionen bei Vögeln

TBE-Virusverbreitung über eine größere Distanz kann durch den alljährlichen Vogelzug von Vogelarten, die im Winter in ihre Winterquartiere ziehen und im Sommer an ihre Brutstätten zurückkehren, erfolgen. Dies wurde aktuell in einer Publikation aus Estland beschrieben, in der von Sperlingen 249 Zecken abgesammelt wurden und eine Zecke TBEV-positiv war (Geller et al. 2013). In einer Studie aus Schweden wurden 1155 Zecken auf TBEV untersucht, die von 13260 Zugvögeln abgesammelt wurden, die auf dem Weg in ihr Winterquartier im Süden waren. Von diesen 1155 Zecken wurden sechs Zecken TBEV-positiv getestet (Waldenström et al. 2007). Basierend auf diesen Daten kann Vogelzug als Verbreitungsmöglichkeit von TBEV-positiven Zecken entlang der Flugrouten beschrieben werden. Das heißt, TBEV kann vermutlich über Zecken, die an den Zugvögeln anhaften, über weite Strecken verbreitet werden (Waldenström et al. 2007; Publikation 5, Frey et al. 2012; Publikation 3, Weidmann et al. 2013; Publikation 1, Frey et al. 2013b). In der Literatur ist zur Seroprävalenz von TBEV in Zugvögeln aus Sibirien eine Studie beschrieben, in der aus 44 verschiedenen Vogelarten 22 Arten auf TBEV serologisch reaktiv getestet werden konnten (Korenberg et al. 1984). Zu TBEV-Erkrankungen in Vögeln gibt es bislang keine Untersuchungen.

4.3.3. TBEV-Infektionen bei Füchsen

Wie mehrere Studien zeigen, sind Füchse ebenfalls Träger TBEV-positiver Zecken oder haben nach einer durchgemachten TBE-Infektion Antikörper gebildet. In einer Studie aus Kroatien wurden von 40 Rotfüchsen Zecken abgesammelt und auf TBEV getestet. Die Zecken hatten eine TBEV-Prävalenz von 1,6% (Jemeršić et al. 2013). Rieger et al. veröffentlichten 1999 eine Studie zur Seroprävalenz von TBEV in Füchsen in Deutschland und Frankreich. Die

Autoren berichten von einer Antikörper-Prävalenz von 9,8% im Ostschwarzwald (n=153), 10% im Odenwald (n=50), 2% im Taunus (n=50), 0% in Brandenburg (n=86) und 1,8% für Nordostfrankreich (n=55). Die Prävalenzwerte der verschiedenen Regionen wurden mit TBE-Risikogebieten verglichen und stimmten überein (Rieger et al. 1999). Eine weitere Schlussfolgerung aus der Studie ist, dass Füchse ein guter Indikator für Risikogebiete sind, da sie in einem engen Umkreis von etwa 7-10 Quadratkilometer leben. Ob Füchse selbst an TBEV erkranken ist bislang nicht bekannt.

5. Phylogenie von TBEV

Für phylogenetische Fragestellungen und die Erstellung von Stammbäumen werden für Flaviviren im Allgemeinen die kodierenden Bereiche des Hüllproteins (E-Gen), der RNS-abhängigen RNS-Polymerase (NS5) oder der Helicase (NS3) verwendet (Zanotto et al. 1996; Billoir et al. 2000; Cook et al. 2006). Phylogenetische Analysen von TBEV auf der Basis des E-Gens ergeben drei genetische Linien, die mit dem europäischen, sibirischen und fernöstlichen Subtyp übereinstimmen (Abbildung 11), (Ecker et al. 1999). Obwohl die Variabilität innerhalb der Subtypen mit maximal 2,2% und zwischen den Subtypen mit maximal 5,6% auf der Aminosäureebene relativ gering sind, haben diese einen großen Effekt auf die Virulenz (Hayasaka et al. 1999; Lindquist et al. 2008). TBE, verursacht durch den fernöstlichen Subtyp, kann mit einer Sterberate von bis zu 30% im Vergleich zur Sterberate beim europäischen Subtyp mit 1-2% deutlich schwerer verlaufen (Wallner et al. 1996).

Zur Klassifizierung der TBEV-Stämme innerhalb der Subtypen werden Referenzstämme verwendet (Hubálek et al 2012). Der europäische Subtyp der TBEV hat die zwei Referenzstämme Hypr (U39292) und Neudoerfl (U27495). Der Referenzstamm Hypr steht stellvertretend für die hochpathogenen TBEV-Stämme des europäischen Subtyps und der Referenzstamm Neudoerfl für die niedrigpathogenen Stämme. Der sibirische Subtyp wird durch die beiden Referenzstämme Aina (JN003206) und Vasilchenko (AF069066) beschrieben (Hubálek et al 2012). Der Referenzstamm des fernöstlichen Subtyps ist der hochpathogene Stamm Sofyin (JF819648), (Hubálek et al 2012). Genetisch mit TBEV eng verwandt ist das Louping ill Virus (LIV) (KF056331). Es wird von manchen Autoren als vierter Subtyp betrachtet (Hubálek et al. 1995; Grard et al.

2007). Der europäische Subtyp ist genetisch näher mit LIV verwandt, als mit dem sibirischen und fernöstlichen Subtyp des TBEV, weshalb beim Erstellen von phylogenetischen Stammbäumen das LIV auch gerne als Outgroup für den europäischen Subtyp verwendet wird (Abbildung 10).

6. Ziel der Doktorarbeit

Das Ziel der im Rahmen der Doktorarbeit durchgeführten Arbeiten war die Charakterisierung von TBE-Viren aus Zecken und Mäusen, deren Typisierung und Vergleiche auf Basis von subgenomischen Fragment- und Gesamtgenomanalysen. Im Folgenden werden fünf Originalarbeiten vorgestellt, die im Rahmen dieser Arbeit publiziert wurden.

III. ORIGINALARBEITEN

1. Publikation 1

Virus Genes
DOI 10.1007/s11262-013-0985-0

Full genome sequences and preliminary molecular characterization of three tick-borne encephalitis virus strains isolated from ticks and a bank vole in Slovak Republic

Stefan Frey · Sandra Essbauer · Gudrun Zöller · Boris Klempa · Gerhard Dobler · Martin Pfeffer

Received: 12 July 2013 / Accepted: 17 September 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract The full genome sequences of three tick-borne encephalitis virus strains, two isolated from *Ixodes ricinus* ticks and one from the brain of a bank vole, *Myodes glareolus*, originating from the Slovak Republic were determined. Nucleotide sequences were found to be very similar (>99.5 % nt-identity) with only one distinct amino acid (aa) difference to each other. They all shared 30 aa-changes when compared to type strain Neudoerfl, isolated in neighboring Austria. An internal poly(A)-stretch similar to that of strain Neudoerfl was found only in TBEV strain 114 from a tick. Despite this heterogeneity in the 3'-NCR, the high level of sequence identity was striking, indicating a low rate of nucleotide substitutions of TBEV strains in Slovakia and no obvious relation to the host species.

Keywords Tick-borne encephalitis virus (TBEV) · Slovakia · Complete genome sequence · *Myodes glareolus* · *Ixodes ricinus*

Introduction

Tick-borne encephalitis virus (TBEV) is a human pathogenic *Flavivirus* within the family *Flaviviridae* [1]. In the past decade, Europe has suffered an increase of human tick-borne encephalitis (TBE), a disease of the central nervous system [2]. At least three subtypes of TBEV with different phylogenetic characteristics and predicted pathogenicity are distinguished, the Western subtype (W-TBEV), the Siberian subtype (S-TBEV) and the Far-Eastern subtype (FE-TBEV) [3]. In Europe, more than 3,400 human TBE cases were reported in the year 2009 which included 70 human TBE cases in Slovak Republic (Slovakia). The incidence of TBE cases in Slovakia is 1.3 per 100,000 populations [2], but incidence rates significantly vary among country districts due to typically occurring natural foci of infection. First reports on TBE in Slovakia date back to late forties and early fifties of the last century [4, 5], and the early studies on TBEV in Slovakia led to elucidation of TBEV focal activity [6, 7] and alimentary route of infection [8–10]. About 5 % of the annual human cases (between <20 and 100) in Slovakia are acquired through the consumption of unpasteurized raw sheep and goat milk products [11, 12]. Since TBE is a mandatory notifiable disease the case numbers and their geographical occurrence in western, southern, and eastern Slovakia are well known, but the genomics of the circulating TBEV strains there have not been thoroughly investigated yet.

The genome of TBEV consists of a single stranded 11 kb (+) RNA coding for one large polyprotein yielding three structural proteins (C, prM, E) and seven non-structural proteins (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5) [13]. Here we describe three new full genome sequences from TBEV isolates from the Slovak Republic, which were part of the historical virus collection of the Department of Virus


S. Frey · S. Essbauer · G. Zöller · G. Dobler · M. Pfeffer
Bundeswehr Institute of Microbiology, Neuherbergstraße 11,
80937 Munich, Germany

B. Klempa
Institute of Virology, Slovak Academy of Science, Dubravská
cesta 9, 84505 Bratislava, Slovakia

B. Klempa
Institute of Medical Virology, Helmut-Ruska-Haus, Charité
University Hospital, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany

M. Pfeffer (✉)
Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health,
University of Leipzig, An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig,
Germany
e-mail: pfeffer@vetmed.uni-leipzig.de

Published online: 26 September 2013

 Springer

Ecology, Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences, and which we analyzed in order to detect particular differences in their genomes which may correspond to the different hosts (tick vs. rodent) they have been isolated from.

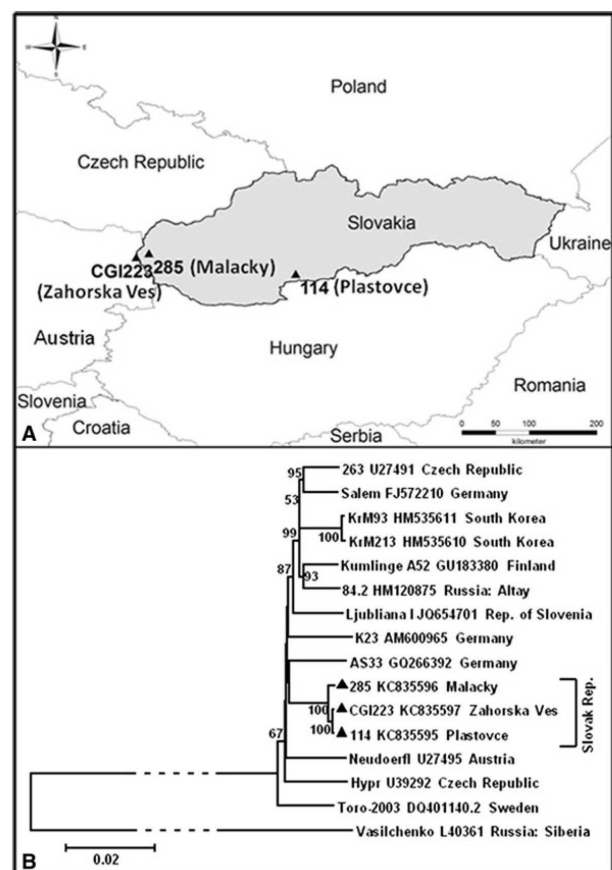
Two TBEV strains were isolated from *Ixodes ricinus* (strain 285 in Malacky and strain 114 in Plastovce) in the year 1990 and in 1980 and were passaged three times (285) and nine times (114) in mouse brains (Fig. 1a). Strain CGI223 was isolated in 1990 in Zahorska Ves from the brain of a bank vole, *Myodes glareolus* (Fig. 1a, [14]). This strain was passaged five times in mouse brains. All three strains were passaged twice in Vero B4 cells, in order to obtain sufficient RNA for nucleotide sequencing. Nucleic acid was extracted from 140 µl of infected cell culture supernatant using the Qiagen Viral RNA-Kit (Qiagen, Hilden) and isolated RNA (40 µl) was stored at -80°C .

Full-genome sequencing was performed using primer pairs based on the genome of strain Neudoerfl (GenBank Acc.

No. U27495; [15]). Overlapping fragments between 950 and 1,400 nucleotides in length were generated. In brief, RT-PCR was performed using 4 µl extracted RNA, the Invitrogen Superscript III Reverse Transcriptase (Life Technologies, Darmstadt, Germany) and 10 µM of each primer. cDNA synthesis was conducted at 50°C for 45 min, followed by denaturation at 94°C for 5 min. DNA was amplified in 40 cycles for 30 s at 94°C , 30 s at 55°C , and 1 min 30 s at 68°C . Final extension was performed at 68°C for 10 min.

Direct sequencing of purified PCR products (Qiagen, Purification Kit) was performed using amplification primers as sequencing primers. Cycle sequencing was carried out with 4 µl purified PCR product and the BigDye Terminator Cycle v 3.1 Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) according to the manufacturer's instructions. Nucleotide sequences were determined using an ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer. Sequence and phylogenetic analyses were calculated with MEGA5 [16].

Fig. 1 a Geographical distribution of the sampling sites in the south-west of Slovakia. TBEV strain 285, isolated from a tick from Malacky, TBEV strain CGI223, isolated from *M. glareolus* from Zahorska Ves and TBEV strain 114 isolated from a tick sampled in Plastovce. **b** Neighbor-joining tree based on complete genomes of TBEV strains from Central Europe was made by the MEGA5 software package [16, 30]. The TBEV strains CGI223 from Zahorska Ves and strain 114 from Plastovce clustered together within one clade and the strain 285 from Malacky built its own clade. TBEV Siberian subtype strain Vasilschenko (L40361) was used as outgroup. Slovakian sequences of TBEV are marked with a triangle



Results and discussion

Full-genome sequence of the Slovakian TBEV isolates 285 (KC835596), CGI223 (KC835597), and 114 (KC835595) were obtained using the primer pairs designed for TBEV strain Neudoerfl [15]. All three strains had a 5'-NCR of 132 nt in length, which was 98.5–99.2 % identical to that of strain Neudoerfl. The 3'-NCRs were 98.3–98.7 % identical to that of strain Neudoerfl and showed more remarkable nt-heterogeneity. In the 3'-NCR position 10487 of the strain 114 a poly(A) tail (A)₃–C–(A)₄₄–G–(A)₂ like the one of strain Neudoerfl (A)₃–C–(A)₄₈ is observed [17]. The poly(A) tract of strain 114 showed a difference in position 10535 A → G in comparison to the poly(A) tail of strain Neudoerfl. In contrast to strain 114, the isolate 285 lacked the poly(A) sequence and had a 149 nt deletion instead, covering the entire poly(A) tract. The strain CGI223 contained the same sequence elements as strain 114 but exhibited an oligo(A) sequence (A)₃–C–(A)₆ at position 10487. The origin of heterogeneity in the 3'-NCR was discussed to be associated with virus propagation in vitro as well as polymerase stumbling across extensive secondary structures of the viral RNA [18–20]. Interestingly, a very similar poly(A) (A)₄–C–(A)₇₄ sequence within the 3'-NCR was also found in Far Eastern subtype virus strain Sofjin [21]. Studies in which the poly(A) tract were abridged or removed however, came to the conclusion that these genome variations do not have significant effects in translation or replication of viral RNA in mammalian cells [22]. Sequence and structure similarities within the 3'-NCR have recently been claimed to function as enhancing elements in both viral replication and translation [23].

With the variable lengths of the 3'-NCR (strain 114: 766 nt, strain 285: 618 nt, strain CGI223: 723 nt) but identical 5'-NCR (132 nt) and polyprotein coding region (ORF) lengths of 10,242 nt (3,414 aa), the full genome length of strain 114 is 11,140 nt, this of strain 285 is 10,992 nt long, and strain CGI223 has a length of 11,097 nt. Regarding the open reading frame (ORF) the three Slovakian TBEV isolates have 30 aa-differences in common and three further positions with individual aa-differences each when compared with strain Neudoerfl (Table 1). Positions with aa-changes were not equally scattered along the viral genome. NS2a (7–8 aa exchanges), NS4b (4–5 aa exchanges), and NS5 (8 aa exchanges) showed a rate higher than 12 % divergence in relation to the entire aa-exchanges (Table 1). Other genome regions showed a moderate rate of aa-exchanges (3–9 %), whereas the PreM-protein showed no aa exchange at all.

Phylogenetic analysis of the complete genomes of the three Slovakian TBEV strains with other available complete TBEV genomes from Central Europe revealed that the three Slovakian strains grouped within an own major clade and in two additional minor clades (Fig. 1b). The strains from Zahorska Ves and Plastovce clustered together

within one clade and the strain from Malacky built its own clade. Interestingly the strains from Zahorska Ves and Plastovce with a geographic distance of more than 180 km between both sampling sites, clustered together and strain 285 from Malacky clustered in another clade though the sampling site is much closer to Zahorska Ves (Fig. 1a). Both sampling sites Malacky and Zahorska Ves are part of the Zahorska Lowland in the southwest of Slovakia, while Plastovce is located in the Danubian Lowland. The direct route is interrupted by the Little Carpathians in the western part of Slovakia. Interestingly, there are no migration routes along river systems [24] or spread along motorway or by train, or any other direct connection which may explain the closer phylogenetic relationship of the TBEV strains from Plastovce and Zahorska Ves. However, birds seem to cross this mountainous region on a regular basis so that migrating birds could transport TBEV-infected ticks from area to area [25, 26]. Recent investigations in Slovakia found an increase in TBE cases in sub-mountainous areas up to 900 m above sea level [27]. In neighboring Austria TBE was acquired at an alpine pasture at an altitude of 1,500 m [28]. Because the highest elevation of the Little Carpathians is 768 m a.s.l., this could argue for a possible direct connection between the strains from the Danubian and the Zahorska Lowlands, but it does not explain the closer genetic relationship of strain CGI223 to strain 114 when compared to strain 285 which was isolated only 15 km away in Malacky. Studies in a single natural focus showed TBEV strains from different genetic clades circulating at the same time, thus, providing evidence for multiple independent TBEV introduction events in a particular area (Dobler et al. unpublished results).

Since strains 114 and 285 were isolated from ticks and sequence CGI223 originated from *M. glareolus*, one could argue that the host species may account for sequence differences found and consequently the different topology in the phylogenetic analyses. But in the described subclade the tick sequence 114 and the bank vole sequence CGI223 clustered together. Both sequences differed in just one aa in the NS2a protein (Table 1). In comparison to the second TBEV strain 285 from a tick-host which clusters in the neighboring cluster just three aa are different to strain CGI223. In summary, these results demonstrate that the TBEV genome is stable within the geographic region of southwestern Slovakia over a period of 11 years and that there seems to be no selective pressure with regard to a particular host. The latter finding is concordance with data from other countries, e.g. neighboring Slovenia showing that the so far limited data on whole genomes of TBEV from different hosts do not show a correlation between TBEV genome sequence and host [29]. However, some particular aa-changes (positions 1384 within NS2b, and 1562 within NS3) have been previously found to be associated with

Table 1 Comparison of the deduced amino acid changes of the three TBEV isolates from Slovakia with type strain Neudoerfl (Acc. No. U27495)

Strain ^a	Amino acid position with exchanges in genes																		
	C		E		NS1	NS2a								NS2b		NS3			
	31	73	447	646		817	1175	1207	1255	1270	1299	1301	1315	1329	1334	1419	1458	1595	1817
Neudoerfl	V	A	I	N	A	V	M	E	F	H	L	R	V	G	Y	I	R	S	S
285	A	S	V	T	T	I	T	D	L	R	L	K	I	R	H	L	K	G	T
CGI223	A	S	V	T	T	I	M	D	L	R	L	K	I	R	H	L	K	G	T
114	A	S	V	T	T	I	M	D	L	R	V	K	I	R	H	L	K	G	T
aa-changes ^c	6 %		6 %		3 %		21–24 %								6 %		9 %		

Strain ^a	Amino acid position with exchanges in genes															
	NS4a		NS4b			NS5							nt-identity ^b		aa-identity ^b	
	2114	2275	2279	2280	2437	2454	2562	2619	2908	2945	3036	3225	3297	3366		
Neudoerfl	D	A	E	R	T	T	V	K	R	R	T	T	A	R	100	100
285	G	V	A	Q	I	T	M	R	K	H	A	A	V	K	97.58	99.09
CGI223	G	V	A	Q	I	I	M	R	K	H	A	A	V	K	97.61	99.09
114	G	V	A	Q	I	I	M	R	K	H	A	A	V	K	97.60	99.06
aa-changes ^c	3 %		12–15 %					24 %								

Positions of the three unique aa-changes among the three strains are given in bold

^a For strain details and Accession numbers, see text

^b In comparison to TBEV strain Neudoerfl

^c Amino acid (aa) changes in % for the given protein, based on the total aa-changes (31/32)

host-range adaptations and different virulence in mice [20]. The authors argue that virus adaptation from ticks to mammals most likely occurs by selection of pre-existing virulent variants from a quasispecies population rather than by the emergence of new random mutations [20]. Such a host adaptation could have taken place in all our three strains, because they have been initially passaged in mouse brain three, five or nine times, but at least their deduced aa-sequences neither show these two particular aa-changes nor does the vole-derived sequence has another unique aa-change when compared to both tick-derived sequences.

Acknowledgments This work is dedicated in memoriam to our friend, and great and honorable scientist Milan Labuda. This study was supported by the Federal Ministry of Education and Research (BMBF) Grant 01KI 0712 to GD and MP.

References

1. C.M. Fauquet, D. Fargette, *Virol. J.* **2**, 64 (2005)
2. O. Donoso-Mantke, C. Escadafal, M. Niedrig, M. Pfeffer, Working Group For Tick-borne encephalitis virus. *Euro Surveill.* **16**(39), 19976 (2011)
3. M. Ecker, S.L. Allison, T. Meixner, F.X. Heinz, *J. Gen. Virol.* **80**(1), 179–185 (1999)
4. D. Blaskovic, *Cas. Lek. Cesk.* **88**(34), 976–979 (1949)
5. H. Libikova, *Lek. Obz.* **1**(3–4), 128–131 (1952)
6. V. Bardos, R. Brezina, J. Hympan, E. Kmety, J. Kratochvil, H. Libikova, O. Macicka, A. Milosovicova, B. Rosicky, V. Somodská, *Bratisl. Lek. Listy* **34**(10–11), 1166–1195 (1954)
7. J. Nosek, J. Rehacek, E. Ernek, M. Gresikova, *Cesk. Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* **11**, 381–385 (1962)
8. M. Gresikova, *Acta Virol.* **2**(2), 113–119 (1958)
9. M. Gresikova, *Acta Virol.* **2**(3), 188–192 (1958)
10. M. Gresikova, J. Rehacek, *Arch. Gesamte Virusforsch.* **9**, 360–364 (1959)
11. M. Labuda, E. Elecková, M. Licková, A. Sabó, *Int. J. Med. Microbiol.* **291**(Suppl 33), 43–47 (2002)
12. P. Pazdiora, J. Benesová, Z. Böhmová, J. Králíková, A. Kubátová, I. Menclová, I. Morávková, J. Průchová, M. Prechová, M. Spáčilová, Z. Vodrážková, V. Struncová, M. Svecová, *Wien. Med. Wochenschr.* **158**(3–4), 91–97 (2008)
13. T.J. Chambers, C.S. Hahn, R. Galler, C.M. Rice, *Annu. Rev. Microbiol.* **44**, 649–688 (1990)
14. O. Kozuch, D. Gurycová, J. Lysý, M. Labuda, *Acta Virol.* **39**, 95–98 (1995)
15. A.M. Kupca, S. Essbauer, G. Zoeller, P.G. de Mendonça, R. Brey, M. Rinder, K. Pfister, M. Spiegel, B. Doerrbecker, M. Pfeffer, G. Dobler, *Ticks Tick Borne Dis.* **1**, 44–51 (2010)
16. K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar, *Mol. Biol. Evol.* **28**(10), 2731–2739 (2011)
17. C.W. Mandl, C. Kunz, F.X. Heinz, *J. Virol.* **65**(8), 4070–4077 (1991)
18. C.W. Mandl, H. Holzmann, T. Meixner, S. Rauscher, P.F. Stadler, S.L. Allison, F.X. Heinz, *J. Virol.* **72**(3), 2132–2140 (1998)
19. G. Wallner, C.W. Mandl, C. Kunz, F.X. Heinz, *Virology* **213**(1), 169–178 (1995)
20. D. Ruzek, T.S. Gritsun, N.L. Forrester, E.A. Gould, J. Kopecky, M. Golovchenko, N. Rudenko, L. Grubhoffer, *Virology* **374**(2), 249–255 (2008)

Virus Genes

21. T.S. Gritsun, K. Venugopal, P.M. Zanotto, M.V. Mikhailov, A.A. Sall, E.C. Holmes, I. Polkinghorne, T.V. Frolova, V.V. Pogodina, V.A. Lashkevich, E.A. Gould, *Virus Res.* **49**(1), 27–39 (1997)
22. V.M. Hoenninger, H. Rouha, K.K. Orlinger, L. Miorin, A. Marcello, R.M. Kofler, C.W. Mandl, *Virology* **377**(2), 419–430 (2008)
23. A. Elväng, W. Melik, Y. Bertrand, M. Lönn, M. Johansson, *Vector Borne Zoonot. Dis.* **11**(6), 649–658 (2011)
24. F. Cagnacci, L. Bolzoni, R. Rosà, G. Carpi, H.C. Hauffe, M. Valent, V. Tagliapietra, M. Kazimirova, J. Koci, M. Stanko, M. Lukan, H. Henttonen, A. Rizzoli, *Int. J. Parasitol.* **42**(4), 365–372 (2012)
25. E. Spitalská, I. Literák, O.A. Sparagano, M. Golovchenko, E. Kocianová, *Wien. Klin. Wochenschr.* **118**(23–24), 759–764 (2006)
26. J. Geller, L. Nazarova, O. Katargina, A. Leivits, L. Järvekülg, I. Golovljova, *Vector Borne Zoonot. Dis.* **13**(7), 443–448 (2013)
27. M. Lukan, E. Bullova, B. Petko, *Emerg. Infect. Dis.* **16**(3), 524–526 (2010)
28. H. Holzmann, S.W. Aberle, K. Stiasny, P. Werner, A. Mischak, B. Zainer, M. Netzer, S. Koppi, E. Bechter, F.X. Heinz, *Emerg. Infect. Dis.* **15**(19), 1671–1673 (2009)
29. L. Fajs, E. Durmišić, N. Knap, F. Strle, T. Avšič-Županc, *PLoS One* **7**(11), e48420 (2012)
30. N. Saitou, M. Nei, *Mol. Biol. Evol.* **4**(4), 406–425 (1987)

2. Publikation 2



Complete Genome Sequence of Tick-Borne Encephalitis Virus Strain A104 Isolated from a Yellow-Necked Mouse (*Apodemus flavicollis*) in Austria

Stefan Frey,^a Sandra Essbauer,^a Gudrun Zöller,^a Boris Klempa,^{b,c} Manfred Weidmann,^d Gerhard Dobler,^a Martin Pfeffer^{a,e}

Bundeswehr Institute of Microbiology, Munich, Germany^a; Institute of Virology, Slovak Academy of Science, Bratislava, Slovakia^b; Institute of Medical Virology, Helmut-Ruska-Haus, Charité University Hospital, Berlin, Germany^c; Department of Virology, University Medical Center Göttingen, Göttingen, Germany^d; Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, Leipzig, Germany^e

This work is dedicated in memoriam to our friend, a great and honorable scientist, Milan Labuda.

Tick-borne encephalitis virus (TBEV) strain A104 was isolated from the brain of a yellow-necked mouse in Austria in 1990. The complete genome sequence was 11,097 nucleotides long. Comparison with TBEV prototype strain Neudoerfl showed 32 amino acid exchanges and the absence of an internal poly(A) stretch within the 3' noncoding region.

Received 25 June 2013 Accepted 8 July 2013 Published 8 August 2013

Citation Frey S, Essbauer S, Zöller G, Klempa B, Weidmann M, Dobler G, Pfeffer M. 2013. Complete genome sequence of tick-borne encephalitis virus strain A104 isolated from a yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*) in Austria. *Genome Announc.* 1(4):e00564-13. doi:10.1128/genomeA.00564-13.

Copyright © 2013 Frey et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 Unported license](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

Address correspondence to Martin Pfeffer, pfeffer@vetmed.uni-leipzig.de.

Tick-borne encephalitis virus (TBEV) is a human-pathogenic flavivirus within the family *Flaviviridae* (1). The genome of TBEV consists of a single-stranded 11-kb (+) RNA coding for one large polyprotein, yielding three structural proteins (C, prM, and E) and seven nonstructural proteins (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, and NS5) (2). Three subtypes of TBEV with different phylogenetic and pathogenic characteristics have been distinguished, the Western subtype (W-TBEV), the Siberian subtype (S-TBEV), and the Far-Eastern subtype (FE-TBEV) (3). In the past decade Europe has suffered an increase of tick-borne encephalitis (TBE), which can cause a disease of the central nervous system (4). In the unvaccinated population of Austria, a total of 8,493 cases of TBE have been reported from 1972 to 2011, with an average incidence rate of about 6 cases per 100,000 population (5). Meanwhile, vaccination has reached >85%, thereby dropping the Austrian incidence rate to 0.9 per 100,000 population (5). Here we describe a new complete genome sequence of a TBEV strain from Austria, which is the first isolate since strain Neudoerfl (1970; accession number U27495) and also the first TBEV strain isolated from a free-ranging mouse for which the complete sequence was determined.

The TBEV strain A104 was isolated from the brain of a yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*) trapped in Wagnitz (Austria) in 1990 (6). The virus was passaged two times in mouse brains. After one passage in VeroB4 cells, nucleic acid was extracted from the infected cell culture supernatant. Full-genome sequencing was performed using protocols described elsewhere (S. Frey, S. Essbauer, G. Zöller, B. Klempa, M. Weidmann, G. Dobler, and M. Pfeffer, submitted for publication). Nucleotide sequences were determined by using an ABI PRISM 3130 genetic analyzer.

Strain A104 had 97.6% nucleotide identity to the Western TBEV prototype strain Neudoerfl. The most remarkable nucleotide heterogeneity was shown in the 3' noncoding region (NCR). At position 10485 of strain A104, a poly(A) tail of A₃-C-A₆ was

observed, which is much shorter than that from strain Neudoerfl, A₃-C-A₄₈ (7). The origin of heterogeneity in the 3' NCR was considered to be associated with virus propagation *in vitro* as well as polymerase stumbling across extensive secondary structures of the viral RNA (8, 9). The deduced polyprotein of strain A104, with a length of 3,414 amino acids (aa), differed by 32 aa from the polyprotein of strain Neudoerfl. Positions with aa changes were not equally scattered along the viral genome. NS2a (4 aa exchanges), NS3 (8 aa exchanges), and NS5 (9 aa exchanges) showed the highest relative aa change rates, whereas prM and NS4a were 100% identical. Phylogenetic analysis of A104 with other available complete TBEV genomes from the W-TBEV showed that the Austrian strain grouped together with strain AS33 (GQ266392) (10) from southeastern Germany and three TBEV strains from Slovakia (KC835595 to KC835597) (Frey et al., submitted). Interestingly, strain A104 showed a closer phylogenetic relationship with the German strain AS33 than with the geographically closer Austrian strain Neudoerfl. The latter finding is concordant with data from neighboring Slovenia, Slovakia, and Germany showing that geographically close does not necessarily mean phylogenetically close (11, 12; Frey et al., submitted). Although this would be expected in a rodent-associated tick-borne virus, other factors will likewise drive geographical distribution of TBEV (11, 12).

Nucleotide sequence accession number. The complete genome sequence of TBEV strain A104 has been deposited in GenBank under the accession number [KF151173](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/KF151173).

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the Federal Ministry of Education and Research (BMBF) grant 01K0712 to M.W., G.D., and M.P.

REFERENCES

1. Fauquet CM, Fargette D. 2005. International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. *Virol. J.* 2:64.

Frey et al.

2. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. 1990. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* 44: 649–688.
3. Ecker M, Allison SL, Meixner T, Heinz FX. 1999. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J. Gen. Virol.* 80:179–185.
4. Donoso Mantke O, Escadafal C, Niedrig M, Pfeffer M, Working Group for Tick-Borne Encephalitis Virus. 2011. Tick-borne encephalitis in Europe, 2007 to 2009. *Euro. Surveill.* 16:pii=19976. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19976>.
5. Heinz FX, Stiasny K, Holzmann H, Grgic-Vitek M, Kriz B, Essl A, Kuni M. 2013. Vaccination and tick-borne encephalitis, Central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 19:69–76.
6. Labuda M, Stünzner D, Kozuch O, Sixl W, Kociánová E, Schäffler R, Výrosteková V. 1993. Tick-borne encephalitis virus activity in Styria, Austria. *Acta Virol.* 37:187–190.
7. Mandl CW, Kunz C, Heinz FX. 1991. Presence of poly(A) in a flavivirus: significant differences between the 3' noncoding regions of the genomic RNAs of tick-borne encephalitis virus strains. *J. Virol.* 65:4070–4077.
8. Wallner G, Mandl CW, Kunz C, Heinz FX. 1995. The flavivirus 3'-noncoding region: extensive size heterogeneity independent of evolutionary relationships among strains of tick-borne encephalitis virus. *Virology* 213:169–178.
9. Mandl CW, Holzmann H, Meixner T, Rauscher S, Stadler PF, Allison SL, Heinz FX. 1998. Spontaneous and engineered deletions in the 3' noncoding region of tick-borne encephalitis virus: construction of highly attenuated mutants of a flavivirus. *J. Virol.* 72:2132–2140.
10. Kupča AM, Essbauer S, Zoeller G, de Mendonça PG, Brey R, Rinder M, Pfister K, Spiegel M, Doerrbecker B, Pfeffer M, Dobler G. 2010. Isolation and molecular characterization of a tick-borne encephalitis virus strain from a new tick-borne encephalitis focus with severe cases in Bavaria, Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* 1:44–51.
11. Fajs L, Durmiš E, Knap N, Strle F, Avšič-Zupanc T. 2012. Phylogeographic characterization of tick-borne encephalitis virus from patients, rodents and ticks in Slovenia. *PLoS One* 7:e48420. doi:10.1371/journal.pone.0048420.
12. Weidmann M, Frey S, Freire CCM, Essbauer S, Růžek D, Klempa B, Zubrikova D, Vögel M, Pfeffer M, Hufert FT, Zanotto PM, Dobler G. 19 June 2013. Molecular phylogeography of tick-borne encephalitis virus in central Europe. *J. Gen. Virol.* [Epub ahead of print.] doi:10.1099/vir.0.054478-0.

3. Publikation 3

Journal of General Virology (2013), **94**, 2129–2139

DOI 10.1099/vir.0.054478-0

Correspondence
Manfred Weidmann
mweidma@gwdg.de

Molecular phylogeography of tick-borne encephalitis virus in central Europe

Manfred Weidmann,¹ Stefan Frey,² Caio C. M. Freire,³ Sandra Essbauer,² Daniel Růžek,^{4,5} Boris Klempa,^{6,7} Dana Zubrikova,⁸ Maria Vögerl,⁹ Martin Pfeffer,¹⁰ Frank T. Hufert,¹ Paolo M. Zanutto³ and Gerhard Dobler²

¹Department of Virology, University Medical Center, 37075 Göttingen, Germany

²Bundeswehr Institute of Microbiology, 80937 Munich, Germany

³Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute – ICB II University of São Paulo, 05508-000 São Paulo, Brazil

⁴Department of Virology, Veterinary Research Institute, Hudcova 70, CZ-62100 Brno, Czech Republic

⁵Institute of Parasitology, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, Branisovska 31, CZ-37005 Ceske Budejovice, Czech Republic

⁶Institute of Virology, Slovak Academy of Science, Dubravska cesta 9, 84505 Bratislava, Slovakia

⁷Institute of Virology Charité University Hospital, Berlin, Germany

⁸Institute of Parasitology, Slovak Academy of Science, Kosice, Slovakia

⁹Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany

¹⁰Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, Leipzig, Germany

Received 18 April 2013
Accepted 13 June 2013

In order to obtain a better understanding of tick-borne encephalitis virus (TBEV) strain movements in central Europe the E gene sequences of 102 TBEV strains collected from 1953 to 2011 at 38 sites in the Czech Republic, Slovakia, Austria and Germany were determined. Bayesian analysis suggests a 350-year history of evolution and spread in central Europe of two main lineages, A and B. In contrast to the east to west spread at the Eurasian continent level, local central European spreading patterns suggest historic west to east spread followed by more recent east to west spread. The phylogenetic and network analyses indicate TBEV ingressions from the Czech Republic and Slovakia into Germany via landscape features (Danube river system), biogenic factors (birds, red deer) and anthropogenic factors. The identification of endemic foci showing local genetic diversity is of paramount importance to the field as these will be a prerequisite for in-depth analysis of focal TBEV maintenance and long-distance TBEV spread.

INTRODUCTION

In the past decade Europe has experienced an increase in tick-borne encephalitis (TBE) incidence, with more than 3400 human TBE cases annually and more than 3600 human TBE cases in Russia in 2009 (Donoso Mantke *et al.*, 2011). Knowledge of the key factors involved in spread and spatiotemporal diversification of the causative viral agent, tick-borne encephalitis virus (TBEV), however, is limited. Field work on the focal activity of TBEV in ticks in central Europe (Labuda *et al.*, 2002) indicates dependence on microclimate, humidity and the 8 °C isotherm (Labuda

et al., 2002; Randolph *et al.*, 2000) and coincidence of tick and host population densities (Cagnacci *et al.*, 2012; Carpi *et al.*, 2008; Randolph *et al.*, 1999; Vor *et al.*, 2010). Several efforts are under way to analyse the tick and animal reservoirs involved in the complex three-host transmission cycle as the tick moults from larva to nymph to adult with a blood meal involved in each step (Achazi *et al.*, 2011; Cagnacci *et al.*, 2012; Klaus *et al.*, 2010; Knap *et al.*, 2012; Labuda & Nuttall, 2004).

As a member of the genus *Flavivirus* of the family *Flaviridae* the genome of TBEV consists of a single-stranded 11 kb (+) RNA coding for one large polyprotein yielding three structural proteins (C, prM, E) and seven non-structural proteins (NS1, 2a, 2b, 3, 4a, 4b, 5)

Three supplementary figures, one supplementary table and one supplementary file are available with the online version of this paper.

(Chambers *et al.*, 1990). It is commonly accepted that the envelope protein (E) plays a major role for the infection of mammalian and tick cells, and that it is the main determinant of virulence and a main target for neutralizing antibodies (Aberle *et al.*, 1999). A recent study looking at the evolutionary rates of two TBEV isolates from the same focus in Finland sampled 44 years apart concluded that the E gene in particular is subject to purifying selection. In spite of high immune pressure it is nevertheless the most constrained gene in the TBEV genome, thereby being a prime target for nucleotide-based phylogenetic analysis (Uzcátegui *et al.*, 2012).

In Germany, TBE infections are mainly reported from the southern federal states of Baden-Württemberg and Bavaria (SurvStat, 2012). Since 2005, detailed data on circulating viruses and corresponding sequences have been under intensive investigation in several foci in Bavaria (Klaus *et al.*, 2010; Kupča *et al.*, 2010; Weidmann *et al.*, 2011). A previously published analysis of 61 central European TBEV-E gene sequences generated from collected ticks unveiled a general east to west spread of TBEV within a small geographical range (Weidmann *et al.*, 2011; Zanotto *et al.*, 1995). On this small scale, a phylogenetic connection between one strain from Nova Rise in the Vysocina region of the Czech Republic (T-730) and one from Germany at Haselmühl (277 km apart) separated by the mountain range of the Bavarian forest (1400 m) implicated a non-continuous distribution pattern and possibly some anthropogenic influence in the TBEV spread. The genetic analysis of the new dataset of 102 TBEV sequences allowed in-depth analysis of possible spread patterns due to landscape features, biogenic and anthropogenic influences of TBEV in central Europe.

RESULTS

Dated tree analysis

In order to obtain a better understanding of TBEV strain spread patterns in central Europe the E gene sequences of an additional 41 TBE viruses collected from 1953 to 2011 from Slovakia (three sites), Austria (two sites) and Germany (14 sites) were determined. This included 26 new TBEV isolates from ticks collected in south-east Germany from 2010 to 2011 (Fig. 1a). In sum, the extended dataset allowed analysis of 102 TBEV-E genes from 38 sites (Table S1, available in JGV Online). The comparison of two alternative schemes for estimating the rate of change (μ) expressed in substitutions per site per year (s^{-1}/y) indicated that a low rate of $4.07 \times 10^{-5} s^{-1}/y$, within the 95 % highest posterior probability density (HPD) interval from 4.05×10^{-5} to $4.08 \times 10^{-5} s^{-1}/y$ had a slightly better Bayes factor (BF) of 1.635 compared with a higher rate of $1.69 \times 10^{-4} s^{-1}/y$, with 95 % HPD from 1.09×10^{-4} to 3.37×10^{-4} , suggestive of a TBEV history time frame spanning more than 300 years in central Europe (mean=314 and 95 % HPD ranging from 261 to 365

years). The rates (μ) that we obtained are in line with previous estimates showing slow evolution of tick-borne viruses compared with mosquito-borne flavivirus (Twiddy *et al.*, 2003; Zanotto *et al.*, 1996). Moreover, our results indicated that the TBEV lineages are split into two main clades, designated clade A and B (Figs S1, S2, Fig. 1b) and experienced purifying selection in the E gene (Table 1).

TBEV spread patterns

Phylogeographic estimates revealed that discrete transitions explain TBEV spread much better than continuous diffusion, since discrete models had significantly higher likelihood (L) than continuous models. BF values did not indicate significant differences between the L from continuous models (Brownian diffusion and Cauchy distribution) and the L from discrete models (Table 2). Moreover, Mantel's test for correlation among matrices of patristic and geographical distances indicated that the relationship between them is significant ($P=9.9999 \times 10^{-6}$). The Mantel's correlogram lacked homogeneity across all geographical distances (Fig. 2) and significant positive correlation (solid squares above the zero line) was found only for distances less than 100 km. Correlation was significantly negative for distances between 100 and 200 km and positive again close to 300 km.

TBEV diversity

The study identified six sites with multiple ($n \geq 5$) E gene sequences. Their local diversity was analysed by bootstrapped maximum-likelihood trees (Fig. 3). TBEV-E nucleotide sequences at Zdar Kaplice ($n=7$, 1986–1987; Weidmann *et al.*, 2011), Borovany ($n=5$, 2000–2002), Burglengenfeld ($n=6$, 2010) and Heselbach ($n=5$, 2011) had low diversity with sequence identities as high as 99.6–99.9 %, while those of sequences at Potepli ($n=7$, 1954–1967) and Haselmühl ($n=17$, 2009–2011) ranged from 94.8 to 99.8 %. At Potepli and Haselmühl both lineage A and B strains were found.

Migratory routes

We analysed local migratory routes over time by estimating discrete state changes among isolation places for all ancestral nodes in time-scaled viral genealogies that were sampled during Markov Chain Monte Carlo (MCMC) convergence. Our results unveiled multiple migratory movements of TBEV from Germany to other places in the East during the past 300 years (Fig. 4, Table 3 and file S4). In the first half of the eighteenth century, multiple lineages of TBEV spread from Germany to Austria, Slovakia, North Bohemia and Central Bohemia. In the second half, the virus went from Germany to North Bohemia and from Central Bohemia to South Bohemia. From there, TBEV was reintroduced to Germany around 1930 and moved to North Moravia around 1970. Moreover, TBEV moved from North Bohemia to South Moravia around 1860.

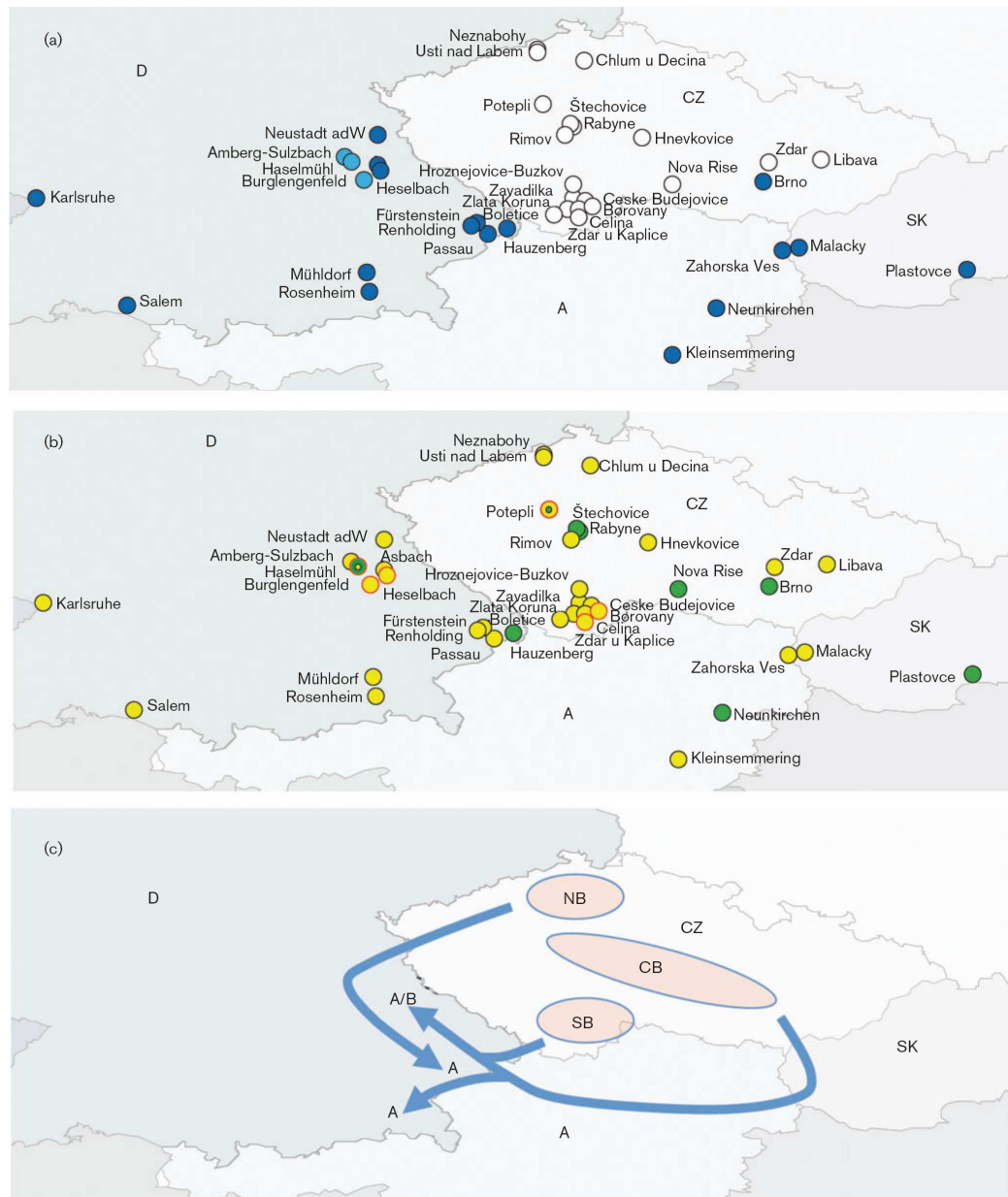


Fig. 1. (a) Sampling sites: white circles, sites of previous study (Weidmann *et al.*, 2011); blue circles, extended set of sampling sites; light blue circles, new isolates at known sites. (b) Distribution of lineages A and B according to the maximum clade credibility (MCC) tree (Fig. S1). Yellow circles, lineage A; green circles, lineage B; circles with red rims, sites with TBEV genetic diversity (Fig. 3); mixed coloured circles, sites with lineage A and B strains. (c) Hypothesized migration routes of TBEV in the twentieth century. Country codes: D, Germany; A, Austria; CZ, Czech Republic; SK, Slovakia. NB, North Bohemia; CB, Central Bohemia; SB, South Bohemia.

Table 1. Codon sites under purifying selection detected in TBEV

Amino acid position*	ω^\dagger	P value
283	-4.80	7.09×10^{-3}
294	-4.08	1.24×10^{-2}
298	-5.00	4.12×10^{-3}
311	-3.00	3.70×10^{-2}
334	-4.00	1.23×10^{-2}
348	-3.00	3.70×10^{-2}
372	-4.71	7.09×10^{-3}
417	-9.13	3.65×10^{-2}
421	-3.00	3.70×10^{-2}
434	-3.53	2.27×10^{-2}
447	-4.00	1.23×10^{-2}
455	-3.00	3.70×10^{-2}
477	-3.00	3.70×10^{-2}
500	-4.71	6.44×10^{-3}
516	-5.88	1.82×10^{-3}
533	-3.53	2.27×10^{-2}
551	-3.00	3.70×10^{-2}
582	-5.00	4.12×10^{-3}
592	-4.71	6.44×10^{-3}
603	-3.53	2.27×10^{-2}
604	-10.59	1.20×10^{-5}
616	-3.33	2.82×10^{-2}
618	-3.53	2.44×10^{-2}
660	-3.53	2.27×10^{-2}
676	-3.00	3.71×10^{-2}
683	-3.53	2.27×10^{-2}
718	-10.70	1.20×10^{-5}
719	-4.04	1.23×10^{-2}
732	-3.03	3.70×10^{-2}
735	-3.82	3.39×10^{-2}
763	-3.03	3.70×10^{-2}

*The amino acid position was related to the first codon of polyprotein sequence of isolate Toro-2003 (GenBank ABD62793.3.).

\dagger Difference between non-synonymous (d_N) and synonymous (d_S) rates per site.

Median joining (MJ) network analysis

Since linear inheritance patterns of viral sequences are amenable to MJ network analysis, we used this approach to

test if the TBEV strains might have migrated to south-east Germany by bypassing the Bavarian or Sumava mountains to the south. The resulting MJ network shows a discontinuous pattern of lineage A and B strains spread across central Europe and several introductions of TBEV strains into Germany (Fig. 5) and allowed spreading patterns to be deduced in great detail.

DISCUSSION

Phylogentic analysis

The analysis of the extended dataset of TBEV-E gene sequences yielded a dated tree spanning more than 300 years and consisting of mainly two subclades designated lineages A and B. About half (48) of the strains analysed are from Germany (mainly Bavaria, Fig. 1a). Lineage A strains branching in a shallow forked subclade, suggest recent introduction at Haselmühl (Fig. 3, Fig. S1). Indeed in both clades, deeply forked subclades intermingling with shallow forked subclades, and could be explained by fairly recent evolutionary events, such as bottlenecks, pruning older lineages from both main clades, a phenomenon also described for mosquito-borne viruses (Zanotto *et al.*, 1996). Moreover, we identified several sites under purifying selection in the E gene (Table 1) and because of their potential bias towards underestimation of branch lengths on time-calibrated phylogenetics, we employed a substitution model with gamma correction (GTR + Γ) to better estimate hidden variation (Wertheim & Kosakovsky Pond, 2011). Nevertheless, patterns of molecular evolution from populations under strong purifying selection were shown to be very similar under simulated conditions to those of populations under neutral selection (Nicolaisen & Desai, 2012; Walczak *et al.*, 2012).

An additional analysis of patristic and geographical distances suggested that TBEV foci appear to cohere below a radius of 100 km, while continuous diffusion breaks apart for greater distances. This leads to suggest two distinct modes of dispersion of TBEV: (i) on a local scale TBEV disperses continuously with positive correlation between low genetic and geographical distances, and (ii) on a regional scale (distances greater than 100 km) TBEV spreads through migration events, since genetic and geographical distances

Table 2. BF values for comparisons among different models used during phylogeographic inferences

	lnP (model/data)	sem	BSSVS*	CTMC \dagger	Brownian diffusion	Cauchy distribution
BSSVS	-5408.819	+/- 0.402	0	-1.062	11.679	11.478
CTMC	-5407.758	+/- 0.348	1.062	0	12.74	12.539
Brownian diffusion	-5420.498	+/- 0.999	-11.679	-12.74	0	-0.201
Cauchy distribution	-5420.297	+/- 0.879	-11.478	-12.539	0.201	0

\dagger CTMC, Continuous time Markov chain.

*BSSVS, Bayesian stochastic search variable selection.

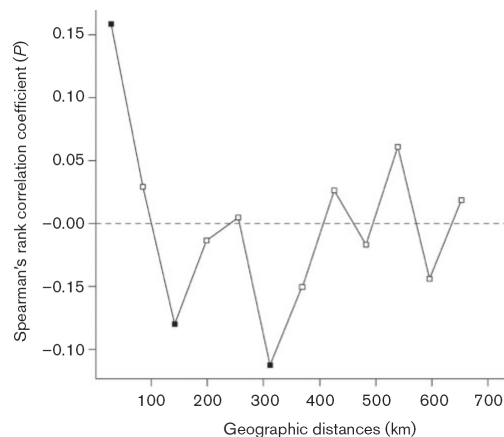


Fig. 2. Mantel's correlogram of patristic and geographical distances. Geographical distances (horizontal axis) plotted against Spearman's rank correlation coefficient (vertical axis). Zero line, no relationship between geographical and patristic distances. Points above the zero line, positive correlation; points below the zero line, negative correlation. Points with statistical significance ($P < 0.05$) are marked with solid (black) squares.

have a negative correlation. This observation is strengthened by the identification of six genetically diverse TBEV foci in total with at least two evolutionary rates and two foci with mixed lineages (Fig. 3).

The migration analysis indicates TBEV spread from Germany to other areas in Europe early in the eighteenth century and it was carried back to it in the twentieth century (Fig. 4). As recently confirmed, the main movement of TBEV appears to follow a clinal distribution oriented primarily from east to west (Heinze *et al.*, 2012; Zanotto *et al.*, 1995). Nevertheless, at a fine grain during short spans of space and time, rather complex spread patterns are expected to emerge. Considering the complex history of this central European region with trade, traffic, economic development and wars going on for centuries, these migrations may only be understandable in greater detail by using larger datasets, possibly comprising more comprehensive viral sequence information and a larger sample.

Landscape-dependent spread patterns

The combination of geographical and genetic information in the MJ network allowed for the analysis of detailed spreading patterns of TBEV. The introduction of one set of lineage A strains to Passau and onward to Amberg-Sulzbach directly linked to strains from Slovakia supports the idea of TBEV strains being introduced to Germany by circumventing the Bavarian mountains to the south (Fig. 1c) via the Danube river system.

Another set of lineage A strains appears to have migrated southward from the Heselbach and Burglengenfeld area in the northern part of south-east Germany. All sites are in proximity to tributaries to the Danube, or in the respective river plains or valleys [Heselbach (Naab), Burglengenfeld (Naab), Renholding (Geißa), Fürstenstein (Ilz), Rosenheim (Inn)].

As humidity and appropriate temperature are important for the life cycle of *Ixodes ricinus* (Randolph & Storey, 1999), it seems very likely that TBEV-infected ticks could easily establish foci along river valleys independently of the means of migration. *I. ricinus* and *Dermacentor reticulatus* have been shown to occur sympatrically (Silaghi *et al.*, 2012), and the latter is currently spreading from east to west along river valleys in Poland and from south to north along the corridor of the Dyje and Morava rivers in the Czech Republic (Široký *et al.*, 2011; Zygner *et al.*, 2009). The Morava flows to the south, directly passing TBEV isolation sites at Zahorska Ves and Malacky in Slovakia to meet the Danube. We therefore hypothesize that the Danube river system supports spread and establishment of new TBEV foci by providing favourable climatic conditions.

Biogenic spread patterns

The migration of lineage A strains towards the south of south-east Bavaria extends directly from strains described in investigations following an emergence of TBE cases in the Usti nad Labem (UNL) region (North Bohemia) in the 1990s (Figs 1b, 5; Weidmann *et al.*, 2011).

A recent comparative study on network calculation methods pointed out that parsimony approaches are less error-prone than MJ methods, with genes showing a high substitution rate as is the case for TBEV gene (Woolley *et al.*, 2008). We therefore also performed a parsimony analysis (Fig. S3). It confirmed the ingression patterns into Germany and particularly the ingression from North Bohemia observed in the MJ analysis.

Public health data in the Czech Republic indicate a general spread of TBE northward and westward (Daniel *et al.*, 2011; Kriz *et al.*, 2012). After eruption of TBE at the end of the 1990s in the UNL region, incidence increased first in the Kralovy Vary region (2001–2010) to the west and then even further west in south-east Bavaria (2001–2012; SurvStat, 2012). The regions Plzen and South Bohemia with the highest morbidity rates in the Czech Republic (10.9 and 23.2 per 10 000) cover the whole remaining expanse of the German–Czech border. Rodent and roe deer (*Capreolus capreolus*) ranges are too small to explain the spread of TBEV-infected ticks over long distances. Red deer (*Cervus elaphus*), however, have much larger resident ranges (<300 ha for females, <700 ha for males; Licoppe & Lievens, 2011) and stags that cannot acquire a herd of females migrate for long distances (<100 km) looking for a herd elsewhere. A population analysis of red deer populations in Sumava Park, on the eastern hillsides of

M. Weidmann and others

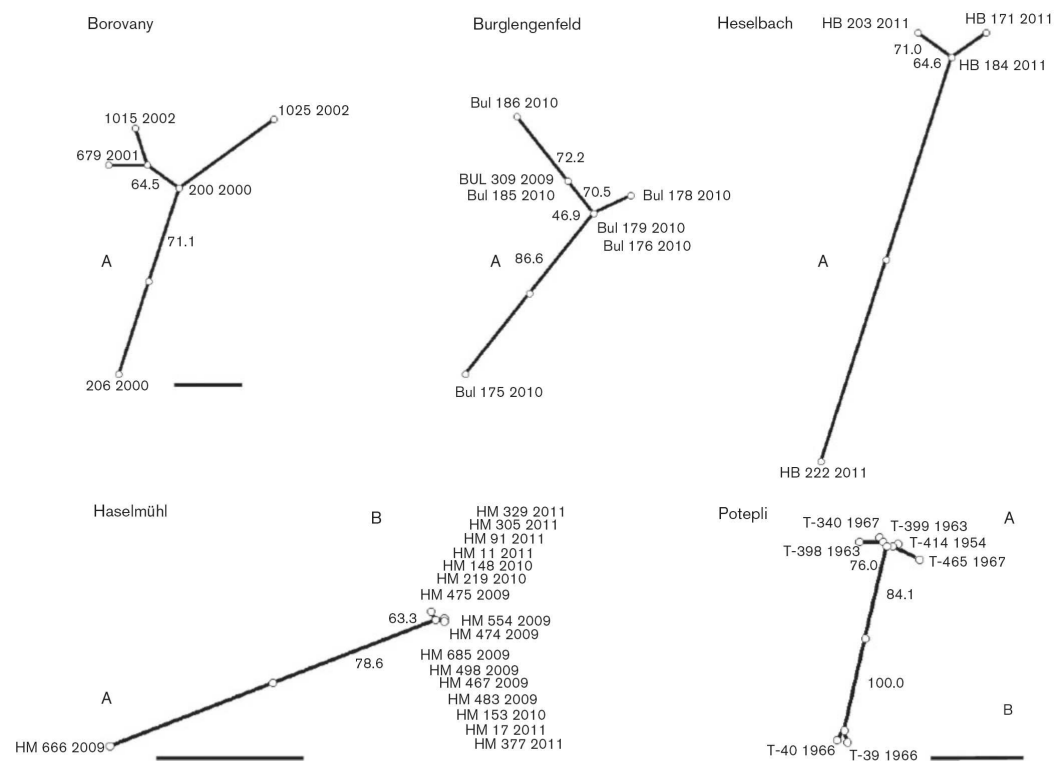


Fig. 3. TBEV-E gene diversity. Upper row: Starplot of TBEV-E gene sequences of isolates from Borovany, Burglengenfeld, Heselbach (one bar for all three sites 9.9×10^{-4} substitutions per site). Lower row: Haselmühl and Potepli (individual bars 1.0×10^{-2} substitutions per site). The bootstrap percentage values are derived from 1000 bootstrap trials. A and B indicate the two main lineages.

the Bavarian forest in Plzen and South Bohemia, provides some additional evidence for tick dispersal via red deer migration. During the cold war the red deer populations on either side of the Bavarian–Bohemian ecosystem were discreetly separated by border fortifications, and this still shows up in matrilineal mtDNA differentiation into predominantly west-European and Czech female red deer populations. Microsatellite-based population analyses, however, reveal that the populations have intermingled since the fortifications were removed two decades ago (Fickel *et al.*, 2012). The concomitant free migration of stags documented in these genetic signatures may have been a route of an accompanying ingress of TBEV-infested ticks into Germany.

In the MJ network, Central Bohemia itself acts as a sort of hub for introductions of TBEV lineage A strains to south-east Bavaria (Mühldorf, Asbach) and in south-west Germany (Salem, Karlsruhe; Fig. 5). Prime candidate mechanisms for this type of spread could involve

migrations of passerine bird species, which have already been implicated in TBEV spread (Hoogstraal *et al.*, 1963; Waldenström *et al.*, 2007).

Anthropogenic spread patterns

Lineage B strains were introduced to Hauzenberg and Haselmühl. Introduction into Haselmühl had stood out at the end of our last phylogeographic analysis (Weidmann *et al.*, 2011) and the MJ network suggests a route from Brno via Nova Rise. This introduction was successful as evident from the many isolates from this site (Fig. 1). The most divergent strain at this site (HM666), however (Fig. 4), is directly connected to two strains from North Bohemia (T-754/II, T-740) indicating the additional arrival of a lineage A strain at this site. Lineage A strains appear also to have been introduced from South Bohemia (e.g. Zdar Kaplice to Mühldorf and on to Asbach). Anthropogenic spread is a prime candidate for all of these introductions, but at this stage cannot be demonstrated as clear cut as described

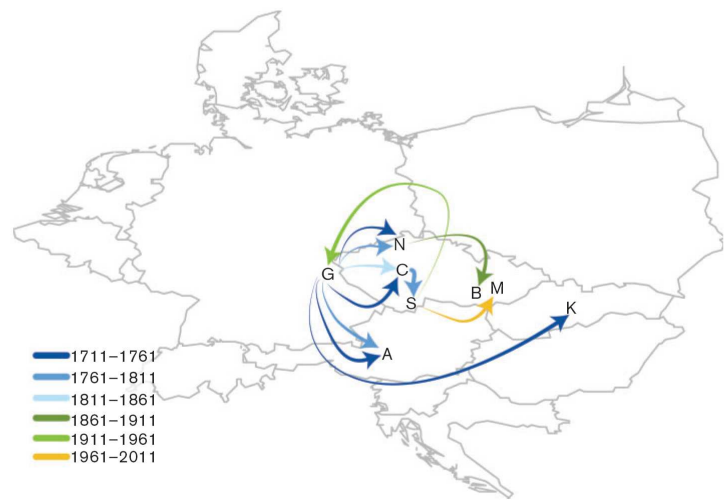


Fig. 4. Fine-grained movement of TBEV in central Europe since the eighteenth century. Directional lines represent migratory events, with arrows connecting sources and destinations. The isolation places are shown by capital letters: Germany (G), Austria (A), Slovakia (K), North Bohemia (N), Central Bohemia (C), South Bohemia (S), South Moravia (B) and North Moravia (M). The last three places are in the Czech Republic. The lines are coloured in agreement with the median of the estimated dates of migration. Also see file S4 and Table 3 to access the confidence interval of estimated dates.

along the Siberian railway thoroughfare in Russia (Kovalev *et al.*, 2009). Prime candidates could be rodents on long-haul lorry transport.

Focal activity

The spread of tick-borne flaviviruses across the Eurasian continent has recently been reanalysed and it appears that the TBEV-Sib and TBEV-Fe types branched off the TBEV-Eur type to migrate towards the east about 3000 years ago in central Asia, whereas TBEV-Eu migrated towards the west (Heinze *et al.*, 2012). The novelty of our data lies in the close examination of natural active TBEV foci, identified by searching for ticks in the area of the residency of confirmed TBE cases.

Focal activity of TBEV is subject to many factors and currently subject to investigation and discussion (Durmiši *et al.*, 2011; Fajs *et al.*, 2012; Lommano *et al.*, 2012). A reset of tick phenology due to conditions during diapause and warming conditions in spring allowing synchronous appearance and co-feeding of at least two of the three tick

Table 3. Estimated dates of migratory events of TBEV in central Europe

Origin	Destination	Median (years)	95 % HPD (years)
Germany	Central Bohemia	1731	1682–1779
Germany	Central Bohemia	1744	1669–1872
Germany	North Bohemia	1744	1669–1872
Germany	Austria	1748	1695–1803
Germany	Slovakia	1754	1701–1807
Germany	North Bohemia	1767	1743–1867
Germany	South Bohemia	1791	1734–1839
Germany	Austria	1809	1708–1867
Germany	Central Bohemia	1815	1755–1873
North Bohemia	South Moravia	1865	1755–1873
South Bohemia	Germany	1922	1894–1943
South Bohemia	North Moravia	1975	1958–1985

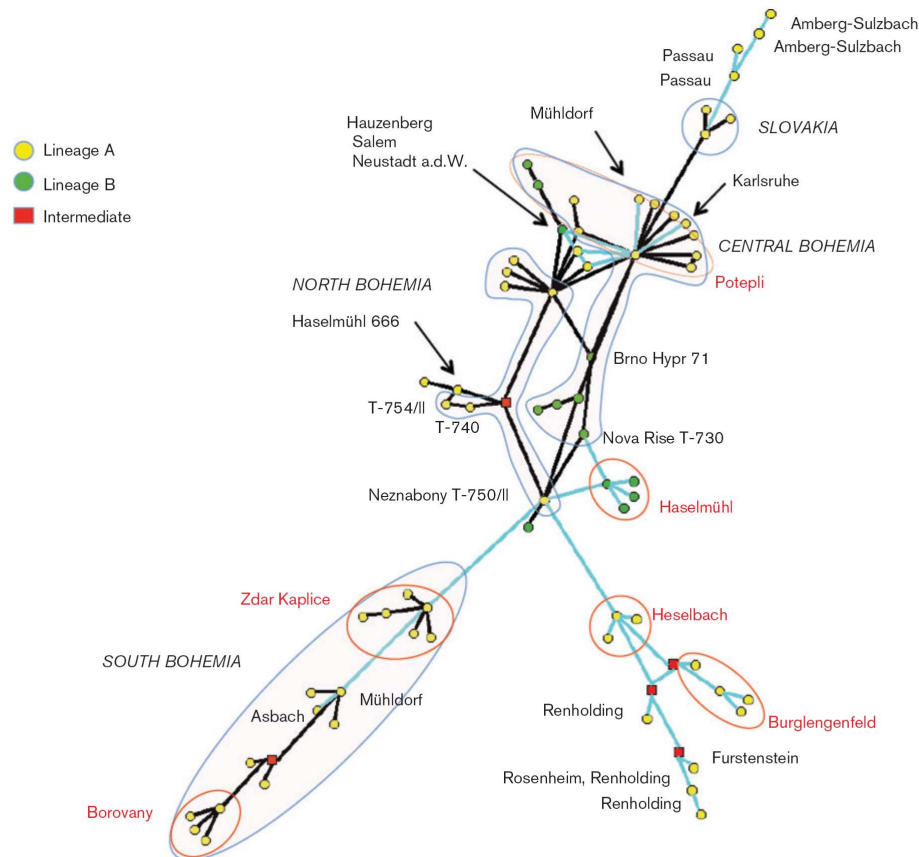


Fig. 5. Reduced MJ network. Plot of a 1228 character set of 102 TBEV-E gene sequences. Yellow circles, lineage A according to MCC tree in Fig. S1; green circles, lineage B. German TBEV-E sequences in the network are depicted in light blue. Central-, South- and North Bohemian clades as defined in Weidmann *et al.* (2011) are highlighted with areas shaded in light red. Foci with diversity (Fig. 3) are highlighted in bright red.

stages (larva, nymph, adult) is essential for saliva-assisted non-viraemic TBEV transmission (Labuda & Randolph, 1999; Randolph *et al.*, 1999). In contrast TBEV emergence at higher altitudes due to climate warming appears to depend mainly on vertical transmission among ticks (Daniel *et al.*, 2004; Danielová *et al.*, 2006).

Long-term studies on TBEV in Russia reveal that reproductive adult male voles with a suppressed immune system due to high testosterone levels are the best amplifiers of TBEV and that the virulence of TBEV increases in tick-host-tick passages (Moshkin *et al.*, 2009). Infection rates in host rodents in turn depend on abundance of tick larvae and nymphs feeding on the adult reproductive voles whose springtime activity coincides with

tick activity, thus establishing horizontal transmission of TBEV among the rodents (Moshkin *et al.*, 2009). More recently, new data on the role of rodents in maintenance of TBEV transmission in Slovenia (Knap *et al.*, 2012) and Scandinavia (Tonteri *et al.*, 2011) support the view that rodents also play a significant role in natural transmission cycles in Europe. Additionally, empirical data supported by mathematical modelling implicate roe deer population densities in sustaining tick populations and therefore TBEV transmission in Slovakia and Italy (Bolzoni *et al.*, 2012; Cagnacci *et al.*, 2012).

Our phylogenetic and network analysis of 102 TBEV-E gene sequences allowed us to infer the diverse recent evolutionary history of TBEV-E gene sequences in central

Europe. It identified local (focal) continuous and long-distance discontinuous spreading patterns of two lineages of TBEV in central Europe and TBEV foci with differing evolutionary rates.

Ecological assessment in respect of climate data, tick and host density data for these genetically diverse TBEV foci will be paramount to obtaining a detailed understanding of the maintenance and spread of TBEV.

The question of why lineages A and B differ in their spread pattern should also be analysed by virological means to characterize replication efficiencies in various cell tissues, dendritic cells and macrophages of relevant host species and in ticks. Since most virological data published to date were presumably generated with lineage B strains (e.g. TBEV strain Hypr71), a comparative analysis may yield important insights into these two lineages and ultimately explain if and how their spreading patterns differ.

METHODS

Virus strains. Viral sequences were obtained from TBEV strains from ticks (*Ixodes ricinus*, *I. hexagonus*), or mammalian hosts (strain 465: *Sciurus vulgaris*; strains V-352, V-361: *Apodemus sylvaticus*; M2 A104: *Apodemus flavicollis*; strains V-364, V-540, M5 CGI223: *Myodes glareolus*) in the Czech Republic (19 sites), Slovakia (two sites), Austria (three sites) and Germany (14 sites) over a period of more than 67 years. In the years 2010 and 2011 questing ticks were collected by flagging the low vegetation at seven sites in south Germany (Haselmühl, Burglengenfeld, Amberg-Sulzbach, Asbach, Neustadt a. d. W., Passau and Heselbach), in the vicinity of recent TBE cases reported by the local health authorities. Ticks were separated according to their sex and developmental stage, morphologically identified to the species level (Hillyard, 1996) and subsequently homogenized and processed for reverse transcription (RT)-PCR as described previously (Frey *et al.*, 2012). The year, host source and geographical location of the particular virus samples are summarized in Table S1.

RNA extraction PCR amplification and sequencing. All sequences generated since 2005 were obtained directly from RNA isolated from tick homogenates, without any isolation or attenuation in cell cultures or mouse brain.

Total nucleic acids were extracted from 200 µl sample using the MagNA Pure LC Total Nucleic Acid (NA) Isolation kit (Roche) and the MagNA Pure LC instrument (Roche). Isolated NA (50 µl) was stored at -80°C . Screening real-time RT-PCR, subsequent envelope (E) gene RT-PCR and sequencing of the screened positive tick samples were performed as described previously (Frey *et al.*, 2012; Weidmann *et al.*, 2011).

Phylogenetic analysis

Sequence alignment:

Nucleotide sequence alignments were performed using CLUSTAL W and bootstrapping (1000 repetitions) in DNASTAR LASERGENE MEGALIGN. Dendrograms were built using DENDROSCOPE (Huson *et al.*, 2007).

Bayesian phylodynamics analysis

For the analysis of the evolutionary history of the TBEV, a 1488 character-long alignment (including gaps) of 106 E genes, connected

to isolation year and sampling site (latitude and longitude), was used for a maximum-likelihood (ML) optimization in GARLI BUILD 0.951 (Zwickl, 2006) using the General Time Reversible (GTR) model of nucleotide substitution (Krejščí, 1949) and optimizing topology, branch lengths, rate heterogeneity and model parameters. The date-stamped samples, allowed to infer a maximum clade credibility (MCC) tree with dated tips and internal nodes using a MCMC Bayesian approach and a GTR model with gamma-distributed rate variation (Γ) and a proportion of invariable sites (I) using a relaxed (uncorrelated lognormal) molecular clock in BEAST v1.5.4 (Drummond & Rambaut, 2007). The GTR+ Γ +I substitution model was used, since it was the best model obtained with MODELTEST (Posada, 2008). A relaxed molecular clock was used since flavivirus evolution generally approximates a molecular clock, but some minor rate differences may occur (Twiddy *et al.*, 2003). Four independent MCMC runs of four chains each were run for 100 million states. The convergence of parameters during MCMC runs was assessed by their effective sample size (ESS) reaching values above 200, as calculated with TRACER v1.5 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>). Since Bayesian inference is highly sensitive to prior selection and because new sequences were being analysed, we tested two different substitution rates to infer TBEV changes in time. Firstly we used an initial substitution rate (μ) of $8.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}/\text{y}$ in agreement with our previous estimate (Weidmann *et al.*, 2011) and we also used a prior based on a coarse rate estimate obtained with the Path-O-Gen v1.3 program (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/pathogen/>), which uses the best ML tree and sampling dates. To assess the best-fit rate to our data, we did a BF test (Suchard *et al.*, 2001) which compares the harmonic mean of the marginal likelihoods for each model. To investigate selection regimens on the E gene, we estimated the difference ($\omega = dN - dS$) between the non-synonymous (dN) and synonymous (dS) rates per codon sites, using the single likelihood ancestor counting (SLAC) algorithm with HyPhy v2.11 (Pond *et al.*, 2005), assuming a significance level of 5% ($\alpha = 0.05$). Thus, ω greater than zero suggests directional selection, while values below zero are indicative of purifying selection.

Phylogeography of TBEV

We tested two major hypotheses of TBEV spread in our area of study: dispersion following a continuous diffusion model (Lemey *et al.*, 2010), and spread by discrete events of migration (Lemey *et al.*, 2009). We also tested if the diffusion rates between localities were homogeneous (Brownian diffusion), or if the diffusion rates were independent following a Cauchy distribution. We fed the continuous models with geographical coordinates from the places of viral isolation. The second scenario was inferred using a continuous time Markov chain (CTMC) model (Lemey *et al.*, 2009) and under the special case of a Bayesian stochastic search variable selection (BSSVS) model. We assigned to each sequence a discrete label in agreement with its place of isolation (Central Bohemia, South Bohemia, North Bohemia, Germany, Slovakia and Austria). The time-scaled phylogenies to reconstruct spread patterns were obtained during the stationarity of four MCMC using BEAST. The MCMC was run for 2×10^8 generations for continuous models and 5×10^7 for discrete models to obtain model convergence. Our sample from the posterior included 10 000 trees that were used to construct the MCC tree. We used the BF test (Suchard *et al.*, 2001) to compare the marginal likelihood obtained from the MCMC for each model, after 1000 bootstrap replicates, to test the best-fit model to the data. The MCC tree from the best model with ancestral states in nodes was plotted in Google Earth software (<http://www.google.com/earth/index.html>), using SPREAD v1.0.5 (Bielejec *et al.*, 2011). In addition, to investigate the relationships between geographical and genetic distances we calculated, from the phylogenetic tree with the best likelihood obtained after 100 independent runs of the GARLI program, the patristic distances using PATRISTIC software (Fourment & Gibbs,

M. Weidmann and others

2006); the geographical distances between two points were estimated using the spherical law of cosines with a Perl script. The correlation between the matrices of geographical and patristic distances was inspected using the Mantel test implemented in the APE package v3.0.2 (Paradis *et al.*, 2004) from the R-project (<http://www.r-project.org/>). We investigated relationships between geographical and patristic distances with a Mantel correlogram (Carrel *et al.*, 2010), which was generated with the Bonferroni multiple correction and Spearman's rank correlation coefficient (ρ), using VEGAN package v2.05 (Oksanen *et al.*, 2012) from the R-project.

MJ network analysis

A network was constructed from a 102 TBEV-E gene 1222 character alignment set stripped of all homogeneous character using SPLITS TREE 4.0 with Epsilon 1 and 2000 spring embedded iterations. A parsimony splits analysis was also used.

ACKNOWLEDGEMENTS

Supporting grants: Czech Science Foundation, no. P502/11/2116; Academy of Sciences of the Czech Republic, grant Z60220518; the AdmireVet project, no. CZ.1.05/2.1.00/01.006 (ED006/01/01) of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic; German Federal Ministry of Education and Research, grant 01KI0710. In addition, we acknowledge CAPES and CNPq-PQ for scholarships received by C. C. M. F. and P. M. A. Z. We are grateful for computational resources provided by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), projects 2010/19341-4 and 2011/17120-3. We thank F. X. Heinz for providing the TBEV Scharl case site.

REFERENCES

- Aberle, J. H., Aberle, S. W., Allison, S. L., Stiasny, K., Ecker, M., Mandl, C. W., Berger, R. & Heinz, F. X. (1999). A DNA immunization model study with constructs expressing the tick-borne encephalitis virus envelope protein E in different physical forms. *J Immunol* **163**, 6756–6761.
- Achazi, K., Růžek, D., Donoso-Mantke, O., Schlegel, M., Ali, H. S., Wenk, M., Schmidt-Chanasit, J., Ohlmeyer, L., Růhe, F. & other authors (2011). Rodents as sentinels for the prevalence of tick-borne encephalitis virus. *Borne Zoonotic Dis* **11**, 641–647.
- Bielejec, F., Rambaut, A., Suchard, M. A. & Lemey, P. (2011). SPREAD: spatial phylogenetic reconstruction of evolutionary dynamics. *Bioinformatics* **27**, 2910–2912.
- Bolzoni, L., Rosà, R., Cagnacci, F. & Rizzoli, A. (2012). Effect of deer density on tick infestation of rodents and the hazard of tick-borne encephalitis. II: population and infection models. *Int J Parasitol* **42**, 373–381.
- Cagnacci, F., Bolzoni, L., Rosà, R., Carpi, G., Haufler, H. C., Valent, M., Tagliapietra, V., Kazimirova, M., Koci, J. & other authors (2012). Effects of deer density on tick infestation of rodents and the hazard of tick-borne encephalitis. I: empirical assessment. *Int J Parasitol* **42**, 365–372.
- Carpi, G., Cagnacci, F., Neteler, M. & Rizzoli, A. (2008). Tick infestation on roe deer in relation to geographic and remotely sensed climatic variables in a tick-borne encephalitis endemic area. *Epidemiol Infect* **136**, 1416–1424.
- Carrel, M. A., Emch, M., Jobe, R. T., Moody, A. & Wan, X. F. (2010). Spatiotemporal structure of molecular evolution of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in Vietnam. *PLoS ONE* **5**, e8631.
- Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R. & Rice, C. M. (1990). Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* **44**, 649–688.

Daniel, M., Danielová, V., Kriz, B. & Kott, I. (2004). An attempt to elucidate the increased incidence of tick-borne encephalitis and its spread to higher altitudes in the Czech Republic. *Int J Med Microbiol* **293** (Suppl 37), 55–62.

Daniel, M., Benes, C., Danielová, V. & Kriz, B. (2011). Sixty years of research of tick-borne encephalitis a basis of the current knowledge of the epidemiological situation in Central Europe. *Epidemiol Mikrobiol Immunol* **60**, 135–155.

Danielová, V., Rudenko, N., Daniel, M., Holubová, J., Materna, J., Golovchenko, M. & Schwarzová, L. (2006). Extension of *Ixodes ricinus* ticks and agents of tick-borne diseases to mountain areas in the Czech Republic. *Int J Med Microbiol* **296** (Suppl 40), 48–53.

Donoso Mantke, O., Escadafal, C., Niedrig, M., Pfeffer, M. & Working Group For Tick-Borne Encephalitis Virus C. (2011). Tick-borne encephalitis in Europe, 2007 to 2009. *Euro Surveill* **16**, pii: 19976.

Drummond, A. J. & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* **7**, 214.

Durmiš, E., Knap, N., Saksida, A., Trilar, T., Duh, D. & Avšič-Županc, T. (2011). Prevalence and molecular characterization of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovenia. *Vector Borne Zoonotic Dis* **11**, 659–664.

Fajš, L., Durmiš, E., Knap, N., Strle, F. & Avšič-Županc, T. (2012). Phylogeographic characterization of tick-borne encephalitis virus from patients, rodents and ticks in Slovenia. *PLoS ONE* **7**, e48420.

Felsenstein, J. (2004). *Inferring Phylogenies*. Sunderland: Sinauer Associates Inc.

Fickel, J., Bubli, O. A., Stache, A., Noventa, T., Jirsa, A. & Heurich, M. (2012). Crossing the border? Structure of the red deer (*Cervus elaphus*) population from the Bavarian–Bohemian forest ecosystem. *Mamm Biol* **77**, 211–220.

Fourment, M. & Gibbs, M. J. (2006). PATRISTIC: a program for calculating patristic distances and graphically comparing the components of genetic change. *BMC Evol Biol* **6**, 1.

Frey, S., Mossbrugger, I., Altantuu, D., Battsetseg, J., Davadorj, R., Tserennorov, D., Buyanjargal, T., Otgonbaatar, D., Zöller, L. & other authors (2012). Isolation, preliminary characterization, and full-genome analyses of tick-borne encephalitis virus from Mongolia. *Virus Genes* **45**, 413–425. (Epub ahead of print).

Heinze, D. M., Gould, E. A. & Forrester, N. L. (2012). Revisiting the clinal concept of evolution and dispersal for the tick-borne flaviviruses by using phylogenetic and biogeographic analyses. *J Virol* **86**, 8663–8671.

Hillyard, P. D. (1996). *Ticks of North-West Europe*. Dorset Press, Dorchester.

Hoogstraal, H., Kaiser, M. N., Traylor, M. A., Guindy, E. & Gaber, S. (1963). Ticks (Ixodidae) on birds migrating from Europe and Asia to Africa 1959–61. *Bull World Health Organ* **28**, 235–262.

Huson, D. H., Richter, D. C., Rausch, C., Dezulian, T., Franz, M. & Rupp, R. (2007). Dendroscope: an interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC Bioinformatics* **8**, 460.

Klaus, C., Hoffmann, B., Hering, U., Mielke, B., Sachse, K., Beer, M. & Süss, J. (2010). Tick-borne encephalitis (TBE) virus prevalence and virus genome characterization in field-collected ticks (*Ixodes ricinus*) from risk, non-risk and former risk areas of TBE, and in ticks removed from humans in Germany. *Clin Microbiol Infect* **16**, 238–244.

Knap, N., Korva, M., Dolinšek, V., Sekirnik, M., Trilar, T. & Avšič-Županc, T. (2012). Patterns of tick-borne encephalitis virus infection in rodents in Slovenia. *Vector Borne Zoonotic Dis* **12**, 236–242.

Kovalev, S. Y., Chernykh, D. N., Kokorev, V. S., Snitkovskaya, T. E. & Romanenko, V. V. (2009). Origin and distribution of tick-borne

- encephalitis virus strains of the Siberian subtype in the Middle Urals, the north-west of Russia and the Baltic countries. *J Gen Virol* 90, 2884–2892.
- Krejčí, J. (1949). [Outbreak of encephalitis virus in the region of Vyškov.] *Lék Listy (Brno)* 4, 73–75, 112–116, 132–134.
- Kriz, B., Maly, M., Benes, C. & Daniel, M. (2012). Epidemiology of tick-borne encephalitis in the Czech Republic 1970–2008. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12, 994–999.
- Kupča, A. M., Essbauer, S., Zoeller, G., de Mendonça, P. G., Brey, R., Rinder, M., Pfister, K., Spiegel, M., Doerrbecker, B. & other authors (2010). Isolation and molecular characterization of a tick-borne encephalitis virus strain from a new tick-borne encephalitis focus with severe cases in Bavaria, Germany. *Ticks Tick-borne Dis* 1, 44–51.
- Labuda, M. & Nuttall, P. A. (2004). Tick-borne viruses. *Parasitology* 129 (Suppl S1), S221–S245.
- Labuda, M. & Randolph, S. E. (1999). Survival strategy of tick-borne encephalitis virus: cellular basis and environmental determinants. *Zentralbl Bakteriol* 289, 513–524.
- Labuda, M., Elecková, E., Licková, M. & Sabó, A. (2002). Tick-borne encephalitis virus foci in Slovakia. *Int J Med Microbiol* 291 (Suppl 33), 43–47.
- Lemey, P., Rambaut, A., Drummond, A. J. & Suchard, M. A. (2009). Bayesian phylogeography finds its roots. *PLOS Comput Biol* 5, e1000520.
- Lemey, P., Rambaut, A., Welch, J. J. & Suchard, M. A. (2010). Phylogeography takes a relaxed random walk in continuous space and time. *Mol Biol Evol* 27, 1877–1885.
- Licoppe, A. & Lievens, J. (2011). Seasonal home ranges of red deer (*Cervus elaphus*) and its impact on the scale of culling management. In *Abstracts XXXth International Union of Game Biologists Congress, 5–9 September 2011, Barcelona, Spain*, p. 319. Available at http://www.alospaincongress.com/contenido/Libre_Abstrats%20retocat%20iugb.pdf
- Lommano, E., Burri, C., Maeder, G., Guerne, M., Bastic, V., Patalas, E. & Gern, L. (2012). Prevalence and genotyping of tick-borne encephalitis virus in questing *Ixodes ricinus* ticks in a new endemic area in western Switzerland. *J Med Entomol* 49, 156–164.
- Moshkin, M. P., Novikov, E. A., Tkachev, S. E. & Vlasov, V. V. (2009). Epidemiology of a tick-borne viral infection: theoretical insights and practical implications for public health. *Bioessays* 31, 620–628.
- Nicolaisen, L. E. & Desai, M. M. (2012). Distortions in genealogies due to purifying selection. *Mol Biol Evol* 29, 3589–3600.
- Oksanen, J., Blanchet, F., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B. & Simpson, G. L. (2012). VEGAN: Community Ecology Package. R package version 2.0–5. <http://cran.r-project.org/package=vegan/index.html>
- Paradis, E., Claude, J. & Strimmer, K. (2004). APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20, 289–290.
- Pond, S. L. K., Frost, S. D. W. & Muse, S. V. (2005). HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics* 21, 676–679.
- Posada, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 25, 1253–1256.
- Randolph, S. E. & Storey, K. (1999). Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (Acari: Ixodidae): implications for parasite transmission. *J Med Entomol* 36, 741–748.
- Randolph, S. E., Miklisová, D., Lysy, J., Rogers, D. J. & Labuda, M. (1999). Incidence from coincidence: patterns of tick infestations on rodents facilitate transmission of tick-borne encephalitis virus. *Parasitology* 118, 177–186.
- Randolph, S. E., Green, R. M., Peacey, M. F. & Rogers, D. J. (2000). Seasonal synchrony: the key to tick-borne encephalitis foci identified by satellite data. *Parasitology* 121, 15–23.
- Silaghi, C., Woll, D., Mahling, M., Pfister, K. & Pfeffer, M. (2012). *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis in rodents in an area with sympatric existence of the hard ticks *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*, Germany. *Parasit Vectors* 5, 285.
- Šíroký, P., Kubelová, M., Bednář, M., Modrý, D., Hubálek, Z. & Tkadlec, E. (2011). The distribution and spreading pattern of *Dermacentor reticulatus* over its threshold area in the Czech Republic –how much is range of this vector expanding? *Vet Parasitol* 183, 130–135.
- Suchard, M. A., Weiss, R. E. & Sinsheimer, J. S. (2001). Bayesian selection of continuous-time Markov chain evolutionary models. *Mol Biol Evol* 18, 1001–1013.
- SurvStat (2012). See <http://www3.rki.de/SurvStat/QueryForm.aspx> Robert Koch Institute.
- Tonteri, E., Jääskeläinen, A. E., Tikkakoski, T., Voutilainen, L., Niemimaa, J., Henttonen, H., Vaheri, A. & Vapalahti, O. (2011). Tick-borne encephalitis virus in wild rodents in winter, Finland, 2008–2009. *Emerg Infect Dis* 17, 72–75.
- Twiddy, S. S., Holmes, E. C. & Rambaut, A. (2003). Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. *Mol Biol Evol* 20, 122–129.
- Uzcátegui, N. Y., Sironen, T., Golovljova, I., Jääskeläinen, A. E., Välimaa, H., Lundkvist, A., Plyusnin, A., Vaheri, A. & Vapalahti, O. (2012). Rate of evolution and molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus in Europe, including two isolations from the same focus 44 years apart. *J Gen Virol* 93, 786–796.
- Vor, T., Kiffner, C., Hagedorn, P., Niedrig, M. & Rühe, F. (2010). Tick burden on European roe deer (*Capreolus capreolus*). *Exp Appl Acarol* 51, 405–417.
- Walczak, A. M., Nicolaisen, L. E., Plotkin, J. B. & Desai, M. M. (2012). The structure of genealogies in the presence of purifying selection: a fitness-class coalescent. *Genetics* 190, 753–779.
- Waldenström, J., Lundkvist, A., Falk, K. I., Garpmo, U., Bergström, S., Lindegren, G., Sjöstedt, A., Mejlom, H., Fransson, T. & other authors (2007). Migrating birds and tickborne encephalitis virus. *Emerg Infect Dis* 13, 1215–1218.
- Weidmann, M., Ruzek, D., Krivanec, K., Zöller, G., Essbauer, S., Pfeffer, M., Zanotto, P. M., Hufert, F. T. & Dobler, G. (2011). Relation of genetic phylogeny and geographical distance of tick-borne encephalitis virus in central Europe. *J Gen Virol* 92, 1906–1916.
- Wertheim, J. O. & Kosakovsky Pond, S. L. (2011). Purifying selection can obscure the ancient age of viral lineages. *Mol Biol Evol* 28, 3355–3365.
- Woolley, S. M., Posada, D. & Crandall, K. A. (2008). A comparison of phylogenetic network methods using computer simulation. *PLoS ONE* 3, e1913.
- Zanotto, P. M. de A., Gao, G. F., Gritsun, T., Marin, M. S., Jiang, W. R., Venugopal, K., Reid, H. W. & Gould, E. A. (1995). An arbovirus cline across the northern hemisphere. *Virology* 210, 152–159.
- Zanotto, P. M., Gould, E. A., Gao, G. F., Harvey, P. H. & Holmes, E. C. (1996). Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 548–553.
- Zwickl, D. J. (2006). *Genetic Algorithm Approaches for the Phylogenetic Analysis of Large Biological Sequence Datasets under the Maximum Likelihood Criterion*. Austin: University of Texas.
- Zygner, W., Górski, P. & Wedrychowicz, H. (2009). New localities of *Dermacentor reticulatus* tick (vector of *Babesia canis canis*) in central and eastern Poland. *Pol J Vet Sci* 12, 549–555.

4. Publikation 4

LETTERS

increased during the past 13 years (6). This trend is accompanied by an increase in the total number of periprosthetic joint infections, even though the overall percentage of this complication is low (7). The most commonly isolated organisms in periprosthetic joint infections are gram-positive cocci, specifically *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis* (8). In a retrospective review, Moran et al. (9) examined the microbiological spectrum of 112 patients undergoing debridement and irrigation for a periprosthetic joint infection (hip [52], knee [51], elbow [4], ankle [3], shoulder [2]) at a tertiary care center in the United Kingdom during 1998–2003. The most frequently isolated microorganisms were coagulase-negative staphylococci (47%) followed by methicillin-sensitive *S. aureus* (44%), methicillin-resistant *S. aureus* (8%), aerobic gram-negative organisms (8%), and anaerobes (7%). Thirty-seven percent of patient specimens grew multiple microorganisms.

We document the ability of *B. extructa* to cause an infection beyond its usual habitat, the oral flora. We hypothesize that the infection in this patient might have developed from hematogenous seeding in which an undiscovered and asymptomatic oral infectious nidus might have served as the seeding focus while mild trauma to the hip could have facilitated access to the joint space.

Acknowledgments

The authors thank Daniel R. Gustafson and the outstanding staff of the Mayo Clinic anaerobic bacteriology laboratory for identification of this patient's bacterium.

Support was provided solely from institutional and departmental sources (Department of Internal Medicine, Division of Infectious Diseases, Mayo Clinic, Rochester, MN).

Dr Patel receives research support as a principal investigator from Pfizer, Pradama, Tornier, Pocared, and Astellas. She

also owns patents on a method and apparatus for device sonication (but has relinquished her rights to receive royalties), an anti-biofilm substance, and *Bordetella pertussis*/parapertussis PCR.

**Benjamin Kloesel,
Margaret Beliveau, Robin Patel,
Robert T. Trousdale,
and Irene G. Sia**

Author affiliation: Mayo Clinic, Rochester, MN, USA

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1907.130078>

References

- Downes J, Olsvik B, Hiom SJ, Spratt DA, Cheeseman SL, Olsen I, et al. *Bulleidia extructa* gen. nov., sp. nov., isolated from the oral cavity. Int J Syst Evol Microbiol. 2000;50:979–83. <http://dx.doi.org/10.1099/0020713-50-3-979>
- Booth V, Downes J, Van den Berg J, Wade WG. Gram-positive anaerobic bacilli in human periodontal disease. J Periodontol Res. 2004;39:213–20. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0765.2004.00726.x>
- Downes J, Munson MA, Spratt DA, Kononen E, Tarkka E, Jousimies-Somer H, et al. Characterisation of Eubacterium-like strains isolated from oral infections. J Med Microbiol. 2001;50:947–51.
- Robertson D, Smith AJ. The microbiology of the acute dental abscess. J Med Microbiol. 2009;58:155–62. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.003517-0>
- Paster BJ, Russell MK, Alpagot T, Lee AM, Boches SK, Galvin JL, et al. Bacterial diversity in necrotizing ulcerative periodontitis in HIV-positive subjects. Ann Periodontol. 2002;7:8–16. <http://dx.doi.org/10.1902/annals.2002.7.1.8>
- Singh JA. Epidemiology of knee and hip arthroplasty: a systematic review. Open Orthop J. 2011;5:80–5. <http://dx.doi.org/10.2174/1874325001105010080>
- Kurtz SM, Lau E, Watson H, Schmier JK, Parvizi J. Economic burden of periprosthetic joint infection in the United States. J Arthroplasty. 2012;27(Supl):61–5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arth.2012.02.022>
- Pulido L, Ghanem E, Joshi A, Purtill JJ, Parvizi J. Periprosthetic joint infection: the incidence, timing, and predisposing factors. Clin Orthop Relat Res. 2008;466:1710–5. <http://dx.doi.org/10.1007/s11999-008-0209-4>
- Moran E, Masters S, Berendt AR, McLardy-Smith P, Byren I, Atkins BL. Guiding empirical antibiotic therapy in orthopaedics: the microbiology of prosthetic joint infection managed by debridement, irrigation and prosthesis retention. J Infect. 2007;55:1–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2007.01.007>

Address for correspondence: Irene G. Sia, Division of Infectious Diseases, Mayo Clinic, 200 First Street SW, Rochester, MN 55904, USA; email: sia.irene@mayo.edu

Tick-borne Encephalitis Virus, Zealand, Denmark, 2011

To the Editor: In Scandinavia, the incidence of tick-borne encephalitis (TBE) is increasing and expanding its geographic range (1). TBE virus (TBEV) types TBEV-Eur and TBEV-Sib occur in Estonia and Finland, along with 2 tick species, *Ixodes persulcatus* and *I. ricinus*. In Denmark, TBE has been reported since the 1950s only from the isolated Bornholm Island in the Baltic Sea with an incidence of ≈4 cases per 100,000 persons (2). Statistical climate-matching models based on the known spatial distribution of TBEV indicate that the present North Zealand climate also would support TBEV-Eur transmission cycles (3). Recently (2008 and 2009), we reported TBE in 2 persons who had histories of tick-bite and originated from a single location in a small forest area (Tokkekøb Hegn) in North Zealand where TBE was previously unrecognized (4).

To determine whether TBE was established in this possibly new TBE focus in mainland Denmark outside Bornholm, we collected ticks by flagging (4) from 3 sites at Tokkekøb during June–July 2011. The 3 sites yielded 896 ticks (854 nymphs, 22 male adults, 20 female adults) in 24 pools. A fourth site at Grib Forest 10 km to the north yielded 198 ticks (183 nymphs, 9 male adult, 6 female adults) in 13 pools.

LETTERS

Flagging was repeated in September 2011 at Tokkekøb to confirm the presence of TBEV and to obtain material suitable for virus isolation. Here, we obtained 7 pools (100 nymphs each) and 1 pool with adults (15 male, 15 female). In September 2011, we also obtained 13 pools (738 nymphs, 37 male adults, 41 female adults) at 3 suspected TBE locations on Bornholm Island. In addition, 1,073 ticks in 58 pools were collected in 2010 and 2011 from deer inspected by the National Center for Wildlife Health from 54 various locations (Figure, panel A). All ticks were identified as *I. ricinus* on the basis of morphology. For TBEV-specific real-time PCR (5), ticks were homogenized in 0.5 mL nucleic acid extraction buffer and RNA/DNA extracted from 0.2 mL homogenate by using the MagNA Pure total NA kit (Roche, Indianapolis, IN, USA). Three of 37 pools (2 with nymphs, 1 with adult females) from Tokkekøb were TBEV RNA positive. None of 58 tick pools from other locations in Denmark or Bornholm were positive for TBEV but contained other pathogens (6). Five of the 8 pools obtained from the second

flagging session (all nymphs) in Tokkekøb were TBEV PCR positive, and 2 yielded isolates (T2, T3) in VeroB4 cell culture. Considering that the duration of the nymphal stage in *I. ricinus* is usually only 1 or 2 years in northern Europe (7), the repeated identification of TBEV in nymphs at the same location in 2009 and 2011 indicates establishment of a new focus of endemic TBEV in Denmark.

Phylogenetic analysis of TBEV-E sequences (1,488 nt) of central European (8) and Scandinavian TBEV strains did not group the Zealand isolate T2 (T3 was not sequenced) with the Bornholm strain but into a subclade with 2 isolates from Sweden, Torö-2003 (9) (GenBank accession no. DQ401140) and Saringe-2009 (GenBank accession no. KC469073); an isolate from Norway (GenBank accession no. EF565947), and isolates from North Bohemia (Czech Republic). The Bornholm strain located into a different subclade containing various sequences from South and Central Bohemia (Figure, panel B). TBEV sequences from the Baltics and Finland

locate to a spate clade. The missing link between the isolates from Bornholm and Zealand also was observed in a median joining network analysis (Splits Tree program, Epsilon1 [www.splitsree.org], 2,000 iterations [data not shown]).

Two severe clinical cases of TBE connected to this new focus occurred in 2008–2009 (4). To search for additional missed clinical TBE cases from this area, we examined serum and cerebrospinal fluid of 96 patients (2007–2009) in whom encephalitis developed after tick bite; these samples were found negative for *Borrelia* spp. by antibody ELISA and PCR (online Technical Appendix, wwwnc.cdc.gov/EID/article/19/7/13-0092-Techapp1.pdf). To assess anti-TBEV seroprevalence, we also tested serum from 78 patients experiencing “summer flu” who had histories of tick bite; this serum was submitted by general practitioners in North Zealand during July–November 2010 (online Technical Appendix). Except for 1 patient infected in Bornholm and 2 patients infected in Sweden, none were

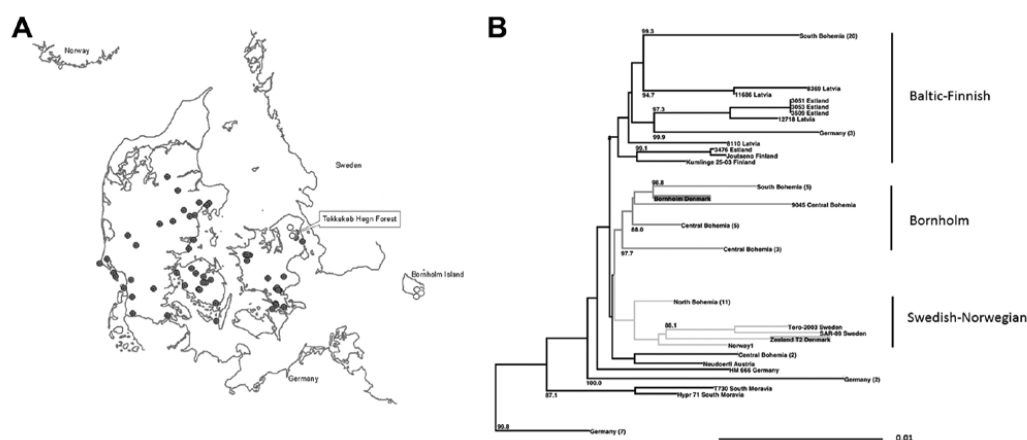


Figure. A) Tick collection areas in Denmark. Red indicates ticks sampled from animals; blue indicates flagging. B) Neighbor-joining phylogenetic analysis of a 1,488-nt set of 78 tick-borne encephalitis virus (TBEV)–Eur E gene sequences including reference strains Neudoerfl (Austria) and Hypr 71 (South Moravia) performed in ClustalW with a 1,000 bootstrap approach (LASERGENE, MEGALIGN, DENDROSCOPE) outgrouped to Louping ill virus (data not shown). Sequence designations of central European strains as in (8). Dark gray indicates Denmark Bornholm clade; white indicates Swedish-Norwegian clade. For simplicity, some subtrees were collapsed; these are designated with region and number of sequences in the collapsed subtree in brackets.

positive by ELISA (Enzygnost Anti-TBE/FSME Virus [IgG, IgM] Siemens, Erlangen, Germany) or PCR (online Technical Appendix). Since the 1980s, Sweden has experienced a 4-fold increase in human TBE incidence, with spread southwest (10). The emergence of the TBEV strain T2 closely related to isolates from Sweden may be a continuation of this geographic trend. A previous antibody study found 3 deer positive for TBEV in Zealand-Falster (2); however, without convincing neutralization data, this finding is not confirmed. The lack of TBEV viremia and seropositivity among the patients in Zealand who had histories of tick bites supports a recent introduction to the new focus. Thus, 2 distinct introductions of TBEV have occurred in Denmark. The underlining environmental or climatic factors driving this geographic trend remain unknown.

Acknowledgment

We thank Anne Lyhning Jensen for expert technical assistance.

Baxter Denmark provided financial support for this study.

**Anders Fomsgaard,
Mette E. Fertner,
Sandra Essbauer,
Alex Y. Nielsen, Stefan Frey,
Pontus Lindblom,
Per-Eric Lindgren,
Rene Bødker,
Manfred Weidmann,
and Gerhard Dobler**

Author affiliations: University of Southern Denmark, Odense, Denmark (A. Fomsgaard); Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark (A. Fomsgaard, M.E. Fertner, A.Y. Nielsen); Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, Munich, Germany (S. Essbauer, S. Frey, G. Dobler); Linköping University, Linköping, Sweden (P. Lindblom, P.-E. Lindgren); Technical University of Denmark, Copenhagen (R. Bødker); and Abteilung Virologie, Universitätsmedizin Göttingen, Göttingen, Germany (M. Weidmann)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1907.130092>

References

1. Jääskeläinen AE, Tonteri E, Sironen T, Pakarinen L, Vaheri A, Vapalahti O. European subtype tick-borne encephalitis virus in *Ixodes persulcatus* ticks. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:323–5. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1702.101487>
2. Skarphédinsson S, Jensen PM, Kristiansen K. Survey of tick-borne infections in Denmark. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:1055–61. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1107.041265>
3. Randolph SE, Rogers DJ. Fragile transmission cycles of tick-borne encephalitis virus may be disrupted by predicted climate change. *Proc Biol Sci.* 2000;267:1741–4. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2000.1204>
4. Fomsgaard A, Christiansen CB, Bødker R. First identification of tick-borne encephalitis in Denmark outside of Bornholm, August 2009. *Euro Surveill.* 2009;14:pii19326.
5. Schwaiger M, Cassinotti P. Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *J Clin Virol.* 2003;27:136–45. [http://dx.doi.org/10.1016/S1386-6532\(02\)00168-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1386-6532(02)00168-3)
6. Fertner ME, Mølbak L, Boye Pihl TP, Fomsgaard A, Bødker R. First detection of tick borne “*Candidatus* Neorhlichia mikurensis” in Denmark 2011. *Euro Surveill.* 2012;17:pii20096.
7. Sonenshine DE. *Biology of ticks*. Vol. 2. New York: Oxford University Press; 1993.
8. Weidmann M, Ruzek D, Krivanec K, Zöller G, Essbauer S, Pfeiffer M, et al. Relation of genetic phylogeny and geographical distance of tick-borne encephalitis virus in central Europe. *J Gen Virol.* 2011;92:1906–16. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.032417-0>
9. Melik W, Nilsson AS, Johansson M. Detection strategies of tick-borne encephalitis in Swedish *Ixodes ricinus* reveal evolutionary characteristics of emerging tick-borne flavivirus. *Arch Virol.* 2007;152:1027–34. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-006-0922-9>
10. Jaenson TGT, Hjertqvist M, Bergström T, Lundkvist A. Why is tick-borne encephalitis increasing? A review of the key factors causing the increasing incidence of human TBE in Sweden. *Parasit Vectors.* 2012;5:184. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-5-184>

Address for correspondence: Anders Fomsgaard, Department of Microbiology Diagnostic and Virology, Statens Serum Institute, 5 Artillerivej, DK-2300 Copenhagen, Denmark; email: afo@ssi.dk

Usutu Virus in Migratory Song Thrushes, Spain

To the Editor: Usutu virus (USUV), a member of the Japanese encephalitis virus antigenic group, was first detected in 1959 in mosquitoes in South Africa (1), and it emerged in 1996 in blackbirds (*Turdus merula*) in Italy (2). Recent cases of USUV infection in asymptomatic blood donors (3) and severe disease in immunocompromised persons (4) have shown its zoonotic potential.

Epidemiology and molecular phylogeny of USUV isolated in Italy, Austria, Hungary, Switzerland, and Germany suggest that stable endemic mosquito–bird cycles have been established in Europe (5,6). Where active vector surveillance programs exist, USUV is detected in mosquitoes before bird deaths and human infections. USUV strains similar to African strains were detected in mosquitoes in Spain in 2006 and 2009 (7,8).

In November 2012, two live song thrushes (*Turdus philomelos*) with central nervous system signs were recovered from a die-off of ≈10 birds at a hunting estate in southern Spain. A full necropsy was conducted on the 2 thrushes (which died shortly after capture), and samples were collected for virus detection and histopathologic examination. Total RNA was extracted from oral and cloacal swab specimens, from serum from a cardiac blood clot, and from heart, kidney, spleen, and brain tissues by using High Pure RNA Tissue Kit (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain) and analyzed by generic flavivirus SYBR Green (QIAGEN, Madrid, Spain) real-time reverse transcription PCR (RT-PCR) and by a generic conventional nested flavivirus RT-PCR (9). The product of the first PCR (1,048 bp) was resin purified, cloned into pGEM-T (Promega, WI, USA), and sequenced.

5. Publikation 5

Virus Genes (2012) 45:413–425
DOI 10.1007/s11262-012-0795-9

Isolation, preliminary characterization, and full-genome analyses of tick-borne encephalitis virus from Mongolia

Stefan Frey · Ilona Mossbrugger · Damdin Altantuul · Jigjav Battsetseg · Rendoo Davaadorj · Damdindorj Tserennorov · Tsoodol Buyanjargal · Dashdavaa Otgonbaatar · Lothar Zöller · Stephanie Speck · Roman Wölfel · Gerhard Dobler · Sandra Essbauer

Received: 31 March 2012 / Accepted: 20 July 2012 / Published online: 31 July 2012
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract Tick-borne encephalitis virus (TBEV) causes one of the most important inflammatory diseases of the central nervous system, namely severe encephalitis in Europe and Asia. Since the 1980s tick-borne encephalitis is known in Mongolia with increasing numbers of human cases reported during the last years. So far, however, data on TBEV strains are still sparse. We herein report the isolation of a TBEV strain from *Ixodes persulcatus* ticks collected in Mongolia in 2010. Phylogenetic analysis of the E-gene classified this isolate as Siberian subtype of TBEV. The Mongolian TBEV strain showed differences in virus titers, plaque sizes, and growth properties in two human neuronal cell-lines. In addition, the 10,242 nucleotide long open-reading frame and the corresponding polyprotein sequence were revealed. The isolate grouped in the genetic subclade of the Siberian subtype. The strain Zausaev (AF527415) and Vasilchenko (AF069066) had 97 and 94 % identity on the nucleotide level. In summary, we herein describe first detailed data regarding TBEV from Mongolia. Further investigations of TBEV in Mongolia and adjacent areas are needed to understand the intricate dispersal of this virus.

Keywords Tick-borne encephalitis virus · Siberian subtype · Mongolia · *Ixodes persulcatus*

Introduction

Tick-borne encephalitis virus (TBEV), *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*, causes one of the most important inflammatory diseases of the central nervous system (CNS), namely severe encephalitis in Europe and Asia. In Europe, more than 3,400 human TBE cases and in Russia more than 3,600 human TBE cases were reported in the year 2009 [1]. Three subtypes of TBEV with different phylogenetic characteristics and predicted pathogenicity are distinguished, the Western subtype (W-TBEV), the Siberian subtype (S-TBEV) and the Far-Eastern subtype (FE-TBEV) [2, 3]. Some authors suggested Louping ill virus and a Siberian–Baltic clade as further distinguishable phylogenetic groups and therefore two more complementing subtypes of TBEV [4]. TBEV occurs in natural foci characterized by ecologic habitats favorable for ticks and is transmitted by *Ixodes* ticks over a wide area from Western Europe to the eastern coast of Japan [5–7]. Humans are only accidental hosts of TBEV and do not play any role in the natural transmission cycle. In Mongolia, TBEV is known since the 1980s with approximately 20 reported cases of human disease annually [8]. A surveillance system for TBE was implemented in Mongolia in 2005. Endemic areas of TBEV associated with severe CNS disease have been reported in the provinces (Aimaks) Selenge and Bulgan in Northern Mongolia close to the Russian border (Fig. 1). Seroepidemiological investigations revealed antibodies against TBEV in human serum samples originating from these provinces (Selenge 5.1 %, Bulgan 0.9 %) [9]. Preliminary sequence data on TBEV were obtained from

S. Frey · I. Mossbrugger · L. Zöller · S. Speck · R. Wölfel · G. Dobler · S. Essbauer (✉)
Department of Virology & Rickettsiology, Bundeswehr Institute of Microbiology, Neuherbergstraße 11, 80937 Munich, Germany
e-mail: sandraessbauer@bundeswehr.org

D. Altantuul · R. Davaadorj
Medical Department Armed Forces Mongolia, Ulaanbaatar, Mongolia

J. Battsetseg · D. Tserennorov · T. Buyanjargal · D. Otgonbaatar
National Center of Zoonotic Diseases, Ulaanbaatar, Mongolia

brain samples of a TBEV patient in 2008. Viral RNA was found in the samples of medulla oblongata, cerebral cortex, and pia mater of brain, but not in the cerebellar tissue. Sequencing of a 520 bp fragment of the envelope gene showed clustering with Far-Eastern strains [8]. However, despite these reports, no data regarding TBEV strains and subtypes are available in detail. We report the isolation of a TBEV from ticks collected in the Mongolian province Bulgan and present first data of its molecular and cellular biological characterization.

Materials and methods

Tick collection

For the detection of TBEV, ticks were collected by flagging the vegetation in the Khyalgant district (soum) of Bulgan province (UTM 48U 4366, 55096) in North Mongolia in July 2010 (Fig. 1). Ticks were stored alive in 50 ml Falcon tubes and transported to the German lab. Ticks were separated according to their sex and developmental stage, morphologically identified to the species level [10] and subsequently processed for RT-PCR and cell culture.

NA extraction

Collected ticks ($n = 64$) were individually sorted in Bio101 Lysing matrix A in 1 ml Minimum essential medium (MEM) containing GlutaMAXTM supplemented with $1\times$ non-essential amino acids solution and $10\times$ Antibiotic-Antimycotics (Invitrogen, Karlsruhe, Germany).

Homogenization was performed twice on level 6 for 30 s with the Fast Prep Savant FP120 instrument (Bio101, Vista, USA). Nucleic acids were extracted from 200 μ l of the supernatant using the MagNA Pure LC Total Nucleic Acid (NA) Isolation Kit (Roche, Mannheim, Germany) and the MagNA Pure LC instrument (Roche). Isolated NA (50 μ l) was stored at -20°C .

Screening real-time RT-PCR and envelope (E)-gene sequencing

5 μ l extracted NA were used for screening of TBEV-specific sequences by a real-time RT-PCR as described in detail before [11]. This RT-PCR amplifies a 68 bp fragment of the 3' non-coding region of all three viral subtypes and is highly sensitive and specific [12]. For the positive sample an envelope (E)-gene-specific RT-PCR was applied [13] (primers see Table 1). RT-PCR products were visualized in a 1 % agarose gel and afterward purified using the QIA quick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Sequencing of the amplification products (approx. 1,686 bp) was directly performed by GATC sequencing service (Konstanz, Germany). Extracted RNA of TBEV strain Hypr was used as a positive control, while distilled water served as a negative control. Inhibition of all samples was monitored by an internal control RT-PCR as described in [11].

Full-genome sequencing

Whole-genome sequencing was performed on NA directly isolated from the tick homogenate (sample No. 14, for details see results). In a first approach primer pairs based on

Fig. 1 Geographical distribution of clinically apparent TBE cases in Mongolia (2005–2010). Aimaks with human TBE cases are marked in gray and numbers of cases within the respective Aimaks are given. Selenge Aimak where most TBEV cases are reported is marked in dark gray. Ticks and the TBEV isolate (MucAr M14/10) in this study originated from Bulgan Aimak (see arrow)



Table 1 Primers for sequencing of the whole genome of the Mongolian TBEV strain

Primer name ^a	Primer sequence	Size (nt)	Amplificate length (bp)	Reference
M14-1	5'-AGA TTT TCT TGC ACG TGC G-3'	19	1187	This paper
TBE-c1187	5'-GCT GCA ACC TTA GTG TCC GAC-3'	21		This paper
TBE-885	5'-GGT TAC CGT TGT GTG GTT GAC C-3'	22	1686 (E-gene)	[13]
TBE-c2571a ^b	5'-CTC CGGG TAG TAGG CAT AAT TG-3'	22		[13]
TBE-c2571b ^b	5'-CTC CGG GTA GTA TGC ATA ATT G-3'	22		[13]
TBE-2209	5'-CTG ACA GTG ATA GGA GAG CAC G-3'	22	933	This paper
TBE-c3141	5'-GGC CAT GAG CAG TTC CTC AG-3'	20		This paper
M14-2949	5'-GTC TGA GAA CAA AAG TCT TC-3'	20	943	This paper
M14-3892	5'-CAA CTC CAA GAC CAA CAA G-3'	19		This paper
M14-3649	5'-CGA GAA TGA GAG CTA GGT-3'	18	1112	This paper
M14-4761	5'-CAT ATC CGA CTC CCA CTT-3'	18		This paper
M14-4670	5'-GAG AGG TGA CAG ACC TTT-3'	18	1328	This paper
M14-5998	5'-GGC TTG ATG TTT GTT CGC-3'	18		This paper
TBE-5496	5'-CAT AGC TGC CAG AGG TCA TTT G-3'	22	1592	[13]
TBE-c7087	5'-GCA GTT GGT GGA TGA TGT AAG G-3'	22		This paper
TBE-6525	5'-CAG TGC CCT GGA TGT CTT CTA CG-3'	22	1153	[13]
TBE-c7677	5'-CTC AGA ACC ACC ACG CCT AC G-3'	20		[13]
M14-7367	5'-CCA TTG TGG TGT CTG GAT-3'	18	1286	This paper
M14-8653	5'-CAG GTT TCA CCG TAC TGT T-3'	19		This paper
M14-8526	5'-AAC ATC GTG AAC TCC GT-3'	17	1400	This paper
M14-9926	5'-CCA ATG TCC TTC CTG GTC TT-3'	20		This paper
M14-9815	5'-CTT GGA AGA ATG CTC GTC A-3'	19	1232	This paper
M14-11046	5'-AGC GGG TGT TTT TCC GAG-3'	18		This paper

^a Numbers correspond to nucleotide positions in the genome of TBEV strain Neudoerfl (GenBank Acc. No. U27495) and strain Zausaev (GenBank Acc. No. AF527415)

^b The two reverse primers TBE-c2571a and TBE-c2571b were used in a proportion of 1:1

the genome of strain Neudoerfl (GenBank Acc. No. U27495) were used [13]. Gaps were closed with newly developed primer pairs based on the obtained sequence fragments and the available genome sequence of TBEV strain Zausaev (GenBank Acc. No. AF527415), see Table 1. Overlapping fragments between 950 and 1400 nucleotides in length were generated. In brief, RT-PCR was performed using 4 µl extracted NA, the Invitrogen Superscript III Reverse Transcriptase (Life Technologies, Darmstadt, Germany) and 10 µM primers. cDNA synthesis was conducted at 50 °C for 45 min, followed by denaturation at 95 °C for 5 min. DNA was amplified in 40 cycles for 30 s at 94 °C, 30 s at 50 °C, and 2 min at 68 °C. Final extension was performed at 68 °C for 10 min. Amplicons were purified as described before. Direct sequencing was performed in both directions with the appropriate primers of the corresponding fragment as described above in detail.

Sequence and phylogenetic analyses

Sequence analyses were carried out with Chromas Lite 2.01 (http://www.techneysium.com.au/chromas_lite.html),

Bioedit 7.0.5.3 [14] and MEGA5 [15]. For full-genome analyses the nucleotide sequences were aligned using the ClustalW algorithm [16] implemented in BioEdit 7.0.5.3 [14] and revised manually. Phylogenetic trees were calculated with MEGA5 [15]. Details on phylogenetic analyses and GenBank Accession Numbers of the sequences included in this study are shown in the corresponding phylogenetic trees.

Virus isolation and titration

In order to isolate TBEV from the real-time RT-PCR positive tick homogenate VeroB4 cells were used. In brief, supernatants of confluent VeroB4 cell monolayers (aged 24 h) were discarded and a 500 µl-aliquot of the real-time RT-PCR positive tick supernatant was inoculated. Infected cell cultures were incubated 1 h at 37 °C (5 % CO₂) and afterwards filled up with MEM (5 % fetal calf serum, FCS). Incubation was performed at 37 °C (5 % CO₂) for at least 7 days or until prominent cytopathogenic changes were visible. After freeze-thawing of the positive culture two sub-passages were performed as described before. In

order to determine the titer of the virus stocks, a plaque-assay was performed in triplicate. VeroB4 cells were grown to 100 % confluence in 12-well plates overnight. Cell supernatants were discarded and monolayers were inoculated with serial log₁₀ dilutions of TBEV. After 1 h of incubation at 37 °C, a methylcellulose overlay (1.25 % in MEM supplemented with 2 % FCS) was added and the plates were incubated for 6 days at 37 °C, 5 % CO₂. Staining was performed overnight with vital stain Neutral red (1:100, 1 mg/100 ml H₂O) or 1 % crystal violet in formalin to visualize plaques.

Propagation of the Mongolian TBEV in neuronal cell-lines

For characterization of the growth properties, the Mongolian TBEV isolate was grown in different mammalian cell-lines. Human neuronal glioblastoma (DBTRG-05MG) and neuroblastoma (SIMA) cells were compared to VeroB4 cell-lines [17, 18]. Virus stocks (2nd passage) of the Mongolian TBEV isolate were generated in neuronal cell-lines and virus titers were determined as described above in VeroB4. For all assays Langat virus (LGTV) strain TP-21

served as control because this virus is closely related to TBEV. Although this virus is a BSL-2 strain it was shown to cause CNS infection in humans when tested as treatment option for brain tumors [19].

Generation of growth curves

Growth curves of the Mongolian TBEV strain and LGTV were established in the three different cell lines: DBTRG-05MG and SIMA cells in comparison to VeroB4. Virus (multiplicity of infection = 0.1 Plaque forming Units, PFU) was inoculated into 25 cm² cell culture flasks and incubated for 1 h at 37 °C, 5 % CO₂. Subsequently, cells were washed two times with PBS (pH 7.4) and 5 ml medium supplemented with 2 % FCS was added. Aliquots of the cell culture supernatant were taken at 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, and 96 h post infection and stored at −60 °C until further examination. For determination of growth back-titration was carried out in VeroB4 cultures using supernatants of the different time points as described above in detail. All growth curves were performed in three replicas and the standard deviation was calculated for each virus and time point.

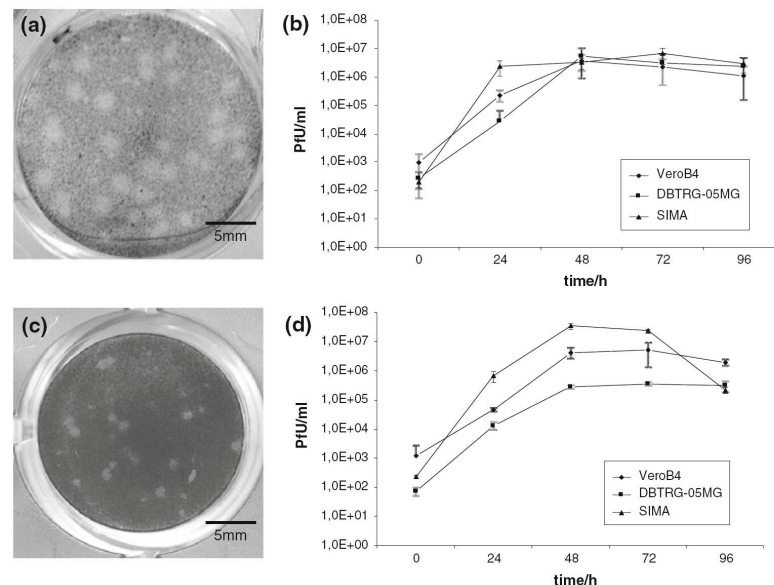


Fig. 2 **a** Plaques size variation of MucAr M14/10 and **c** LGTV in VeroB4 cells. **b** Growth curves of MucAr M14/10 in human neuroblastoma cells (DBTRG-05MG), human glioblastoma cells (SIMA), and VeroB4 cells. **d** Growth curves of LGTV in human neuroblastoma cells (SIMA), human glioblastoma cells

(DBTRG-05MG), and VeroB4 cells. For both viruses, higher titers were achieved in SIMA and VeroB4 cells in comparison to DBTRG-05MG cells. For both viruses a plateau was reached 48 h p.i. in all three cell-lines

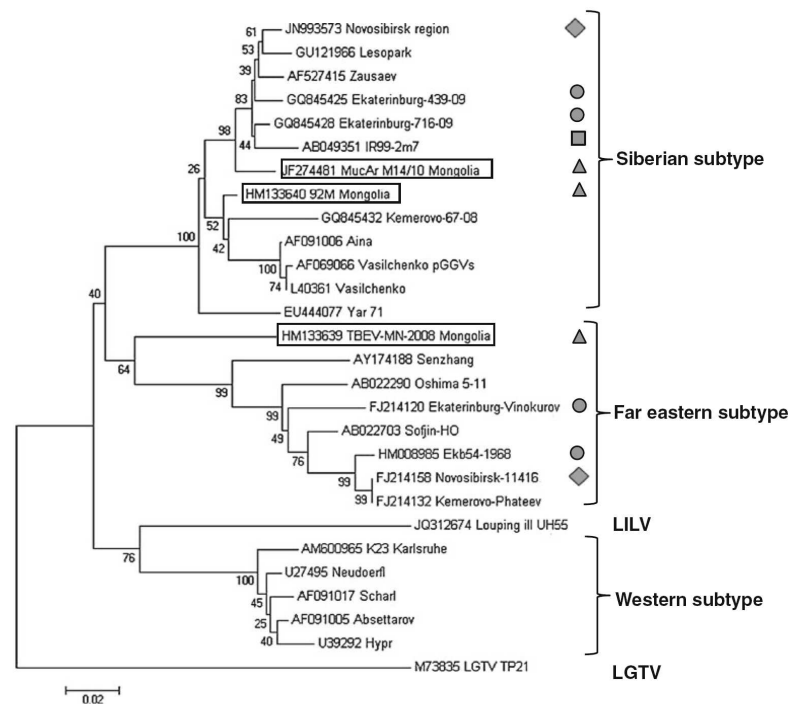


Fig. 3 Phylogenetic tree of TBEV strains based on 1,488 nucleotides corresponding to the open-reading frame of the E-gene using the Neighbor-Joining method of the MEGA5 software package [15, 34]. The optimal tree with the sum of branch length = 0.80470302 is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1,000 replicates) is shown next to the branches [35]. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Tamura 3-parameter method [36] and are in the units of the number of base substitutions per site. The analyses involved 28 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st + 2nd + 3rd + Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 457 positions in the final dataset. Langatvirus TP21 (M73835) was used as outgroup. Mongolian sequences of TBEV are marked with a box. The Mongolian isolate MucAr M14/10 (JF274481) generated in this study clusters with strains of the Siberian subtype. Two Mongolian sequences from

GenBank are further included: 92 M (HM133640) also clusters in the Siberian subtype, whereas TBEV-MN-2008 (HM133639) grouped to the Far-Eastern subtype. Scale bar indicates number of nucleotide substitutions per site. Abbreviations and GenBank Accession Numbers are as follows: *Siberian Subtype*: JN993573, Novosibirsk 2730; GU121966, Lesopark; AF527415, Zausaev; GQ845425, Ekaterinburg-439-09; GQ845428, Ekaterinburg-716-09; AB049351, IR99-2m7; GQ845432, Kemerovo-67-08; AF091006, Aina; AF069066, Vasilchenko pGGVs; L40361, Vasilchenko; EU444077, Yar 71; *Far-Eastern Subtype*: AY174188, Senzhang; AB022290, Oshima 5-11; FJ214120, Ekaterinburg Vinokurov; AB022703, Sofjin-HO; HM008985, Ekaterinburg 54-1968; FJ214158, Novosibirsk 11416; FJ214132, Kemerovo Phateev; *Louping ill virus* (JQ312674); *Western Subtype*: AM600965, Karlsruhe K23; U27495, Neudoerfl; AF091017, Scharl; AF091005, Absettarov; U39292, Hypr; Shaded circle (Ekaterinburg region), quadrangle (Irkutsk region), rhombus (Novosibirsk region), and triangle (Mongolia) mark sequences from same origin

Results and discussion

TBEV is present in *Ixodes persulcatus* ticks in Mongolia

A total of 64 ixodid ticks (*Ixodes (I.) persulcatus*) were collected by flagging. One out of 64 (1.6 %) extracted RNAs tested positive in the TBEV-specific real-time

RT-PCR whereas no RT-PCR inhibition was shown in all samples. This sample exhibited a low CT value (tick No. 14, CT: 21.39) corresponding to a high viral RNA load. The prevalence of TBEV in ticks depends on the geographical location of risk areas and may vary within natural TBEV foci [20]. In endemic areas in Europe, the TBEV prevalence in ticks varied from 0.5 to 5 % [21, 22], whereas tick infection rates in Siberia ranged

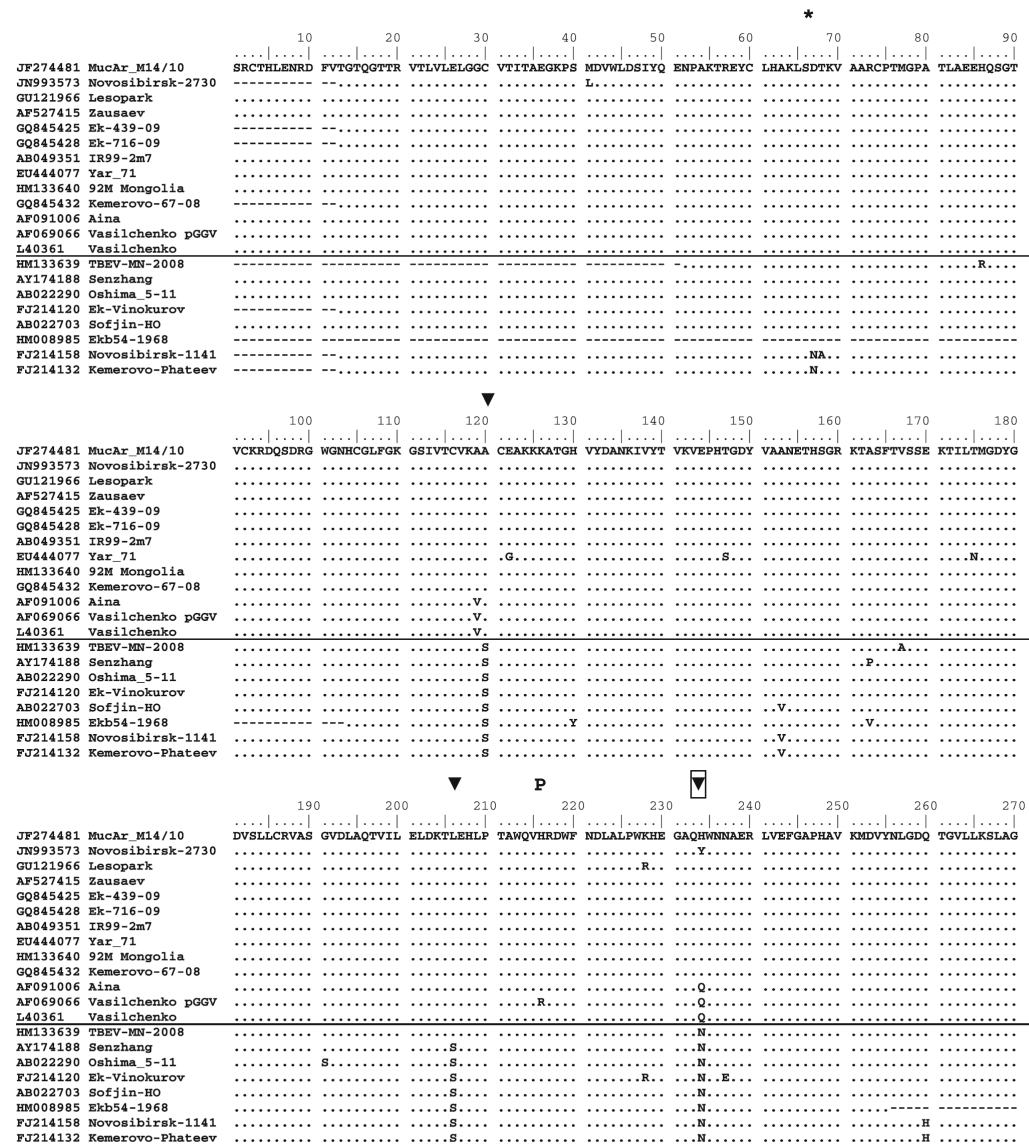


Fig. 4 Alignment of amino acid sequence of the E-protein of selected members of the Siberian and Far-Eastern clusters. For detailed description of GenBank numbers see Fig. 3. *Inverted triangle* mark aa positions that seem to distinguish the Siberian and the Far-Eastern cluster. **T** marks aa 426 that was discussed to be present in tick-

transmitted viruses [27]. **P** indicates aa that have been discussed to play a role in pathogenicity. The box indicates aa that distinguish the two Siberian subclusters. * is an aa residue that may be responsible for encephalitis

between 0.5 and 10.2 % [23] but prevalences up to 40 % have also been reported [24]. The TBEV prevalence (1.6 %) found in Mongolian ticks was within the range

reported for endemic regions in Eurasia. However, it might be biased by the small sample size investigated here.

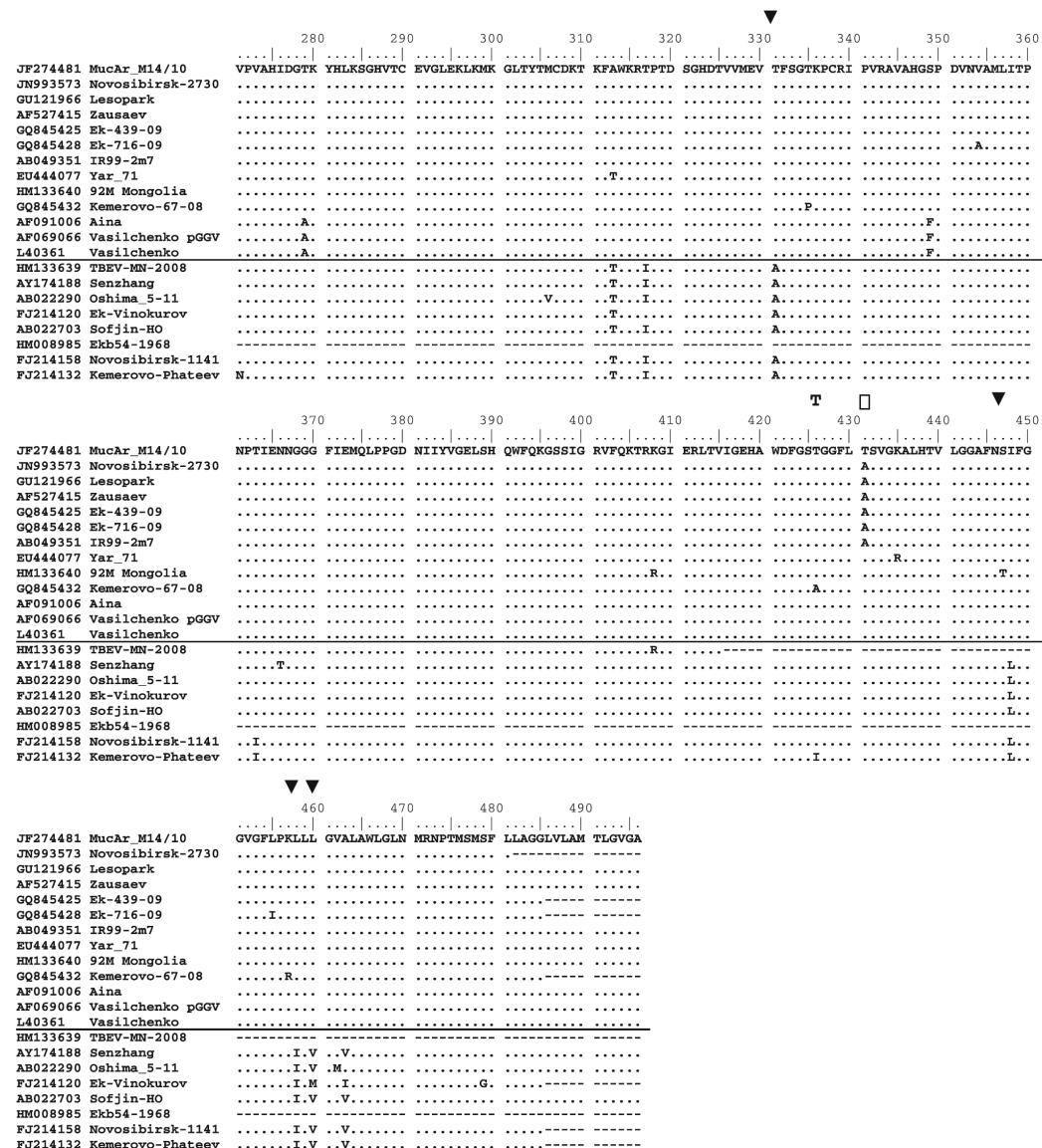


Fig. 4 continued

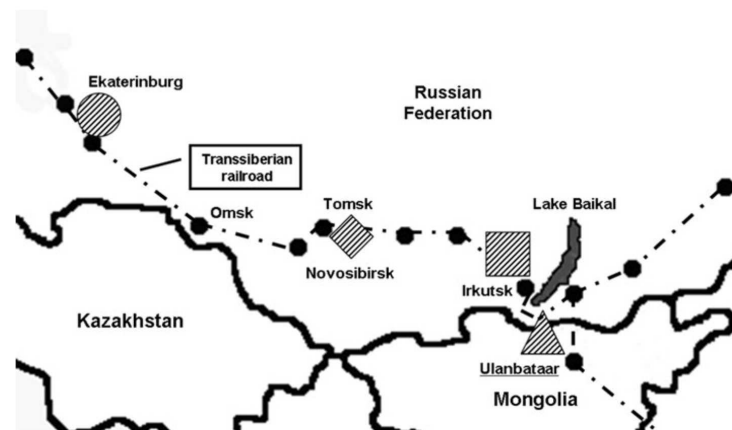
Isolation of the Mongolian TBEV strain and investigation of its growth characteristics

The real-time RT-PCR positive tick homogenate (No. 14) was used for virus isolation in Vero-B4 cell-lines. The first cytopathic effects (cpe) occurred 5 days post infectionem

(p.i.) and were characterized by general detachment of cells. The titer of the 2nd sub-passage of the TBEV isolate from Mongolian *I. persulcatus* (designated MucAr M14/10) in VeroB4 cells was 2.5×10^6 PFU/ml.

In further experiments, growth of MucAr M14/10 in human neuronal glioblastoma (DBTRG-05MG) and

Fig. 5 Possible dispersal of TBEV along the Transsiberian railroad track. Shaded circle, quadrangle, rhombus, and triangle mark the four regions along the Transsiberian railroad, where E-gene sequences in the tree shown in Fig. 3 originated



neuroblastoma (SIMA) cell-lines was compared to VeroB4 cells. Cpe in all cell-lines was characterized by general detachment of cells (approximately 80 %) 5 days p.i. Virus titers obtained were 5×10^6 PFU/ml (VeroB4), 1.5×10^6 PFU/ml (DBTRG-05MG), and 1.5×10^6 PFU/ml (SIMA), respectively. Virus titers obtained for Langat virus were 1×10^7 PFU/ml (VeroB4), 3.1×10^6 PFU/ml (DBTRG-05MG), and 6.5×10^7 PFU/ml (SIMA), respectively. Thus, 6 days p.i. MucAr M14/10 induced heterogeneous plaques with varying plaque sizes (0.5–3 mm), whereas LGTV produced homogeneous plaques of 0.5–1 mm (Fig. 2a, c) and reached higher titers. Enlarged plaques as seen for MucAr M14/10 have for example been discussed to be associated with an aa change (R to H) at position 216 (E-gene) corresponding to position 496 of the polyprotein [25]. For TBEV beneath mutations in the E-gene and PrM-E nucleotide sequence, changes in the encoding region of the non-structural proteins (e.g. NS2B, NS3, NS5) and the non-coding region were reported to influence plaque sizes [26–28]. In general enlarged plaques in flaviviruses are believed to give phenotypic evidence of increased growth in cell cultures. For several flaviviruses (e.g., yellow fever virus, Japanese encephalitis virus, West Nile virus) and for TBEV formation of enlarged plaques could perhaps be a correlate for an increased neuropathogenicity [25, 28]. Further comparative studies are needed to clarify these correlations.

One-step growth curve analyses were performed in three replicates. It was revealed that both viruses, MucAr M14/10 and LGTV TP-21, reached a plateau with the highest titers at 48 h p.i. in all cell-lines used. For MucAr M14/10, at 24 h p.i. growth was considerably enhanced up to 100-fold in SIMA and VeroB4 compared to DBTRG-05MG cell-lines. At 48 h and 72 h p.i. growth in both neuronal cell-lines was slightly enhanced (0.3–1.5 log) in comparison to VeroB4

cells. In comparison for LGTV titers in SIMA were tenfold higher at 24, 48, 72 h p.i. in contrast to VeroB4, and approximately 100-fold compared to titers in DBTRG-05MG. Growth curves including calculated standard deviations for each time point are shown in Fig. 2b and d.

In comparison to Japanese Encephalitis virus (JEV), another member of the genus *Flavivirus*, MucAr M14/10 exhibits comparable growth characteristics in neuronal cell-lines. Hence, JEV titers in neuroblastoma cells and in glioblastoma cells differ at 1-log [29]. Our Mongolian TBEV isolate further provides the possibility for comparative studies. MucAr M14/10 and LGTV replicated in the glioblastoma cells not as well as in the VeroB4 or in the neuroblastoma (SIMA) cell-lines (Fig. 2b, d). This is in discrepancy to previous published findings that some TBEV strains might replicate equivalent in glioblastoma cells and neuroblastoma cells [30]. These differences might also mirror the usual function of the two different neuronal cell types. During replication the macrophagic function of glia-cells might be activated which may lead to a lower amount of infected cells. Further investigations regarding the susceptibility of different neuronal cell types for TBEV have to be performed to understand the underlying mechanisms.

E-gene sequence of the Mongolian TBEV clusters with the Siberian clade

E-gene-specific primers amplified a 1,686 bp RT-PCR product from NA isolated from tick homogenate No. 14. Direct sequencing of the amplicons resulted in a 1,615 nucleotide (nt)-fragment including the 1,488 nt of the E-gene (Accession number: JF274481). Sequence and subsequent phylogenetic analyses classified our isolate as

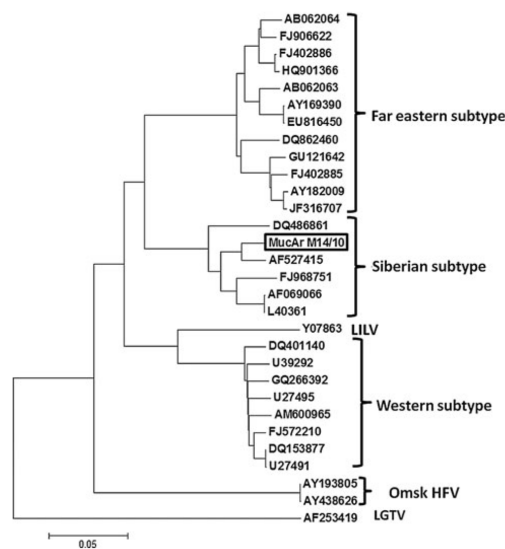


Fig. 6 Phylogenetic tree based on 31 full-genome sequences of TBEV strains. Neighbor-Joining method was used with MEGA 5 software package [15, 30]. The optimal tree with the sum of branch length = 1.05437049 is shown. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method [44] and are in the units of the number of base substitutions per site. The analysis involved 30 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st + 2nd + 3rd + Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 10,241 positions in the final dataset. Abbreviations and GenBank Accession Numbers are as follows: *Far-Eastern subtype*: AB062064, Sofjin-HO; FJ906622, Primorye-89; FJ402886, Dalnegorsk; HQ901366, Primorye-1153; AB062063, Oshima 5-10; AY169390, Primorye-332; EU816450, Primorye-212; DQ862460, Glubinnoe/2004; GU121642, Svetlogorie; FJ402885, Kavalerovo; AY182009, Senzhang; JF316707, MDJ-02; *Siberian subtype*: DQ486861, Ekaterinburg-328; AF527415, Zausaev; FJ968751, Kolarovo-2008; AF069066, infectious clone of Vasilchenko; L40361, Vasilchenko; *LILV* Loupig ill virus, Y07863; *Western subtype*: DQ401140, Toro-2003; U39292, Hypr; GQ266392, AS33; U27495, Neudoerfl; AM600965, K23; FJ572210, Salem; DQ153877, tr263v; U27491, 263; *Omsk HFV* Omsk hemorrhagic fever virus: AY193805, Bogoluvovska; AY438626, Kubrin; *LGTV* Langat virus strain TP21, AF253419

Siberian subtype of TBEV (Fig. 3). Comparison of the E-gene sequence with GenBank entries revealed highest similarities on both, the nucleotide level (96.7 %) and the amino acid (aa) level (99.5–99.7 %), to sequences of a subclade of the Siberian TBEV subtype, IR99-2m7 (AB049351), Ekaterinburg-716-09 (GQ845428), Ekaterinburg-439-09 (GQ845425), Zausaev (AF527415), Lesopark (GU121966), and isolate 2730 from Novosibirsk (JN993573). Comparison of the E-proteins of Siberian and Far-Eastern strains included in the phylogenetic analyses

revealed aa positions that may distinguish the strains of the Siberian from the Far-Eastern subtype (Fig. 4, marked with triangle). These are aa 120 (A vs. S), aa 234 (H, Q, Y vs. N), aa 331 (T vs. A), aa 447 (I vs. L), aa 457 (L vs. I), aa 459 (L vs. V, M), and presumably aa 206 (L vs. S, with exception of HM133639). In former studies it was concluded that the presence of L and H at aa position 206 and 234, respectively, confirm the Siberian subtype [31, 32]. Furthermore, within the Siberian subtype two sub-clusters can be distinguished based on aa changes at positions 234 and 431. One cluster including strain Zausaev is characterized by H234/A431, whereas strains of the second cluster (e.g., Vasilchenko, Aina) revealed Q234/T431 [24, 25]. Interestingly, MucAr M14/10 shared characteristics of both sub-clusters (H234/T431) which may reflect its in-between position (see box in Fig. 4). It has been discussed that strains of the Siberian subtype transmitted by *I. persulcatus* typically possess threonine at aa position 426 [32, 33] which also applies to our strain MucAr M14/10. Moreover, highly pathogenic viruses of the Siberian subtype have been described to possess Histidine at aa 496 of the polyprotein corresponding to aa position 216 in the E-gene [23–25]. All strains except the infectious clone of Vasilchenko (AF069066) aligned in Fig. 4 revealed H at position 216. For low pathogenic strains Arginine seems to be prominent at this position [25]. Further investigations are needed to prove these hypotheses with respect to tick transmission and/or pathogenicity of TBEV strains.

Is TBEV transmitted by human activity which implies that Mongolia may be a melting pot for TBEV variants?

In this study, two further sequences of Mongolian TBEV available from GenBank were included. One E-gene sequence of TBEV (HM133640) from *I. persulcatus* also grouped within the Siberian subtype but in another sub-cluster as the sequence of MucAr M14/10 (Fig. 3). The second available sequence originated from brain tissue of a patient with meningoencephalitis (TBEV MN2008, HM133639) and, interestingly, clustered within the Far-Eastern subtype of TBEV. These data illustrate that at least two TBEV subtypes, the Siberian and the Far-Eastern subtype, may circulate in Mongolia. Evidence of different subtypes seems also to be found in the Baikal region (Zlobin, personal communications). The MucAr M14/10 sequence is closely related to the TBEV strains Zausaev (AF527415), and Ekaterinburg-439-09 (GQ845425) and the strains in the respective genetic subclade with the strains Lesopark (GU121966) and Novosibirsk (JN993573). Several of these viruses were isolated along the Trans-Siberian Railway between Tomsk (Zausaev), Novosibirsk (Lesopark), and Irkutsk (IR99-2m7) (Figs. 3, 5). Recently, Kovalev and coworkers [37] suggested a

Table 2 Comparison of nucleotide sequences and amino acid sequences (polypeptide) among TBEV MucAr M14/10 (JF274481) and closely related TBEV strains Zausaev (AF527415) and Vasilchenko (AF069066)

Name of gene/protein	nt homology compared to		aa homology and aa exchanges compared to	
	Zausaev AF527415	Vasilchenko AF069066	Zausaev AAO43537	Vasilchenko AAD34205
5' non-coding region (%)	98	98	–	–
(132nt)	(119/121nt ^a)	(118/121nt ^a)		
Core (%)	98	96	98	96
(with anchor)	(329nt/336nt)	(323nt/335nt)	(110aa/112aa)	(107aa/112aa)
(336nt, 112aa)			(R69K, K80M)	(I45F, R69K, T73A, A84T, I87V)
Membrane (%)	98	95	99	98
(504nt, 168aa)	(495nt/504nt)	(479nt/503nt)	(167aa/168aa)	(164aa/168aa)
			(T114A)	(F115L, R121K, V266I, A267T)
Envelope (%)	97	94	99	99
(1488nt, 496aa)	(1440nt/1488nt)	(1396nt/1488nt)	(495aa/496aa)	(491aa/496aa)
			(T711A)	(A399V, H496R, H514Q, T559A, S629F)
NS1 (%)	97	94	99	99
(1056nt, 352aa)	(1024nt/1056nt)	(996nt/1056nt)	(347aa/352aa)	(351aa/352aa)
			(V848A, M899V, I1053V, E1055G, K1070R)	(I1053T)
NS2a (%)	97	93	99	98
(690nt, 230aa)	(672nt/690nt)	(643nt/690nt)	(229aa/230aa)	(225aa/230aa)
			(V1228G)	(V1228G, L1253F, F1270L, F1303I, S1327T)
NS2b (%)	97	96	99	98
(393nt, 131aa)	(383nt/393nt)	(377nt/393nt)	(130aa/131aa)	(129aa/131aa)
			(I1480L)	(L1466F, I1480L)
NS3 (%)	96	95	99	99
(1863nt, 621aa)	(1797nt/1863nt)	(1764nt/1863nt)	(617aa/621aa)	(614aa/621aa)
			(A1741V, S1743G, T1876S, T1936I)	(R1505K, D1553N, I1618V, A1661V, T1675M, V1747M, T1876S)
NS4a (%)	98	96	100	99
(447nt, 149aa)	(437nt/447nt)	(439nt/447nt)	(149aa/149aa)	(148aa/149aa)
				(M2167V)
NS4b (%)	97	93	100	99
(756nt, 252aa)	(733nt/756nt)	(705nt/755nt)	(252aa/252aa)	(251aa/252aa)
				(A2464V)
NS5 (%)	97	94	99	98
(2709nt, 903aa)	(2627nt/2712nt)	(2546nt/2712nt)	(896aa/903aa)	(881aa/903aa)
			(T2541A, V2757I, I2747V, G2808R, R2916K, R3033K, G3389E)	(S2514A, M2562T, T2688A, T2690A, T2706A, Q2713R, V2772I, K2783R, R2916K, S2918N, S2933N, R3033K, K3074R, A3145S, A3217E, I3237V, Q3355H, R3366K, M3385I, I3386V, G3389E, K3392R)
Polypeptide (%)	97	94	99	98
(10245nt, 3414aa)	(9937nt/10245nt)	(9659nt/10245nt)	(3392aa/3414aa)	(3361aa/3414aa)
3' non-coding region (%)	53	81	–	–
(information on lengths differ, ca. 730nt)	(354nt/669nt ^a)	(541nt/669nt ^a)		

^a For the 5'-NCR and the 3'-NCR only partial sequences could be obtained and compared even though RACE was performed on the genome ends (data not shown detail)

possible association between the distribution of the Siberian TBEV subtype and historical man-made events, mainly the construction of the first land road and the Trans-Siberian Railway. Our sequence data may be a phylogenetic hint for a further distribution in eastern direction and along the northern part of the southern Siberian Mountains (including Altai, Sayan, Baikal Mountain) and maybe even toward Beijing, China or vice versa along man-made routes (Figs. 3, 5). This suggestion may also be supported by the observation that Siberian and Far-eastern TBEV subtypes both occur in Mongolia and the adjacent region of Russia. Figure 3 illustrates that strains from Novosibirsk region cluster in both subtypes (S-TBEV JN993573, FE-TBEV FJ214158). This phenomenon is also observed for viruses from Ekaterinburg region (GQ845425 or FJ214120) or Kemerovo region (GQ845432 or FJ214132). Hence, these data support the hypothesis of multiple introduction or spread of the Siberian and Far-Eastern TBEV strains e.g., along the Transsiberian route. However, for a final proof of this hypothesis more phylogenetic data from Siberian subtype strains originating from Mongolia, Russia, and China are needed.

The presence of at least two TBEV subtypes in Mongolia implicate that this country might be a melting pot for different viruses. Livestock may also contribute to the dispersal and maybe a mixing of TBEV strains. In particular, sheep and goat are numerous in Mongolia. *Ixodes persulcatus* parasitizes all mammals accessible and birds and TBEV might also be carried by migrating flocks and their accompanying animals carrying TBEV-positive ticks over larger areas [38–40]. Migrating birds have been found to harbor TBEV-positive ticks [39, 41] and therefore might also contribute to the world-wide dispersal of the virus. As described for the Baltic countries (Estonia, Latvia, Lithuania) and Czech Republic changes in the socio-economic situation, enhanced mobility as well as changes in agriculture and livestock production associated with the end of the Soviet rule, might also influence an increased abundance of infected ticks and the exposure of humans to these ticks [42, 43].

Full-genome sequence of the Mongolian TBEV strain resembles that of other Siberian strains

A further effort of this study was to obtain the full-genome sequence of the Mongolian TBEV MucAr M14/10 using already established and new primer pairs. We obtained 11,035 nucleotides including (1) 121 nt of the partial 5' non-coding region (5'-NCR) (2) the 10,242 nt open-reading frame (including Stop-codon 10,245 nt) corresponding to 3,414 aa, and (3) 669 nt of the partial 3'-NCR (JQ429588). 5'- and 3'-RACE failed to obtain full length sequence on the genome ends (data not shown in detail). The 121 nt

partial 5'-NCR was 98 % similar to that of strain Zausaev (AF527415). This closely related strain was isolated from a patient who died from a fatal form of chronic progressive TBE [24]. Phylogenetic comparison of the Mongolian TBEV with 31 strains available from GenBank confirmed the results obtained with the E-gene (Fig. 6). The Mongolian TBEV was closest related to strain Zausaev (AF527415.1) with a 97 % similarity on the nucleotide level and a 99 % identity on the aa level. Despite the high similarity in the coding region MucAr M14/10 has no comparable characteristic gaps in the 3' untranslated region of strain Zauseav.

Within the most conserved regions of the E- and NS2a-gene only 1 aa substitution was detected. The highest heterogeneity was found in the NS1-, NS3-, and NS5-gene with 5, 4, and 7 aa substitutions, respectively. Compared to strain Vasilchenko (AF069066.1) 94 % of the nucleotide sequence and 99 % of the corresponding aa were identical. In contrast to strain Zausaev, nearest homology was found to NS1-, NS4a-, and NS4b-gene sequences (1 aa substitution) whereas multiple substitutions were determined in the Core- (5 aa), E- (5 aa), NS2a- (5 aa), NS3- (7 aa), and NS5- (22 aa) gene region. A comparison of the NCRs, ORFs and the corresponding translated regions of the Mongolian TBEV and strains Zausaev and Vasilchenko is summarized in Table 2. Further studies will focus on phenotypical and pathogenetic differences to these two strains.

In summary, we herein describe first detailed data regarding TBEV from Mongolia. However, in order to finalize a picture of TBEV expansion more genetic data of circulating TBEV strains in Mongolia and adjacent areas will be necessary. Further in conclusion our data underline that human activity might be a driving force in the distribution of TBEV from West to East and vice versa.

Acknowledgments We thank M. Pollaerts, M. Wagner, H. Weber, and G. Zöller for their technical assistance. This study was supported by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF), grant number 01KI0710, "Research on Zoonotic Infectious Diseases" program, "Emerging arthropod-borne viral infections in Germany: pathogenesis, diagnostics and surveillance". The views expressed in this article are those of the author and do not necessarily reflect the official policy or position of the German Department of Defense or the German government.

Conflict of interest All authors claim no conflict of interest.

References

1. M.O. Donoso, C. Escadafal, M. Niedrig, M. Pfeffer, & Working Group For Tick-Borne Encephalitis Virus Tick-borne encephalitis in Europe, 2007 to 2009, Euro Surveill. **16**(39), pii = 19976 (2011)
2. M. Ecker, S.L. Allison, T. Meixner, F.X. Heinz, Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. J. Gen. Virol. **80**(1), 179–185 (1999)

3. C.M. Fauquet, D. Fargette, International committee on taxonomy of viruses and the 3,142 unassigned species. *Virology* **2**, 64 (2005)
4. G. Grard, G. Moureau, R.N. Charrel, J.J. Lemasson, J.P. Gonzalez, P. Gallian, T.S. Gritsun, E.C. Holmes, E.A. Gould, X. de Lamballerie, Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. *Virology* **361**, 80–92 (2007)
5. S.Y. Kovalev, V.S. Kokorev, I.V. Belyaeva, Distribution of Far-Eastern tick-borne encephalitis virus subtype strains in the former Soviet Union. *J. Gen. Virol.* **91**, 2941–2946 (2010)
6. B.Y. Si, T. Jiang, Y. Zhang, Y.Q. Deng, Q.B. Huo, Y.C. Zheng, E.D. Qin, C.F. Qin, Q.Y. Zhu, Complete genome sequence analysis of tick-borne encephalitis viruses isolated in northeastern China. *Arch. Virol.* **156**, 1485–1488 (2011)
7. M. Weidmann, D. Ruzek, K. Krivanec, G. Zoller, S. Essbauer, M. Pfeffer, P.M. Zanotto, F.T. Hufert, G. Dobler, Relation of genetic phylogeny and geographical distance of tick-borne encephalitis virus in central Europe. *J. Gen. Virol.* **92**, 1906–1916 (2011)
8. M.A. Khasnatinov, G.A. Danchinova, N.V. Kulakova, K. Tunglalag, E.V. Arbatskaia, L.V. Mironova, D. Tserennorov, G. Bolormaa, D. Otgonbaatar, V.I. Zlobin, Genetic characteristics of the causative agent of tick-borne encephalitis in Mongolia. *Vopr. Virusol.* **55**, 27–32 (2010)
9. G. Walder, E. Lkhamsuren, A. Shagdar, J. Bataa, T. Batmunkh, D. Orth, F.X. Heinz, G.A. Danichova, M.A. Khasnatinov, R. Würzner, M.P. Dierich, Serological evidence for tick-borne encephalitis, borreliosis, and human granulocytic anaplasmosis in Mongolia. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**(Suppl 40), 69–75 (2006)
10. P.D. Hillyard, *Ticks of North-West Europe* (The Dorset Press, Dorchester, 1996)
11. M. Schwaiger, P. Cassinotti, Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *J. Clin. Virol.* **27**, 136–145 (2003)
12. O.D. Mantke, S.W. Aberle, T. Avšič-Županc, M. Labuda, M. Niedrig, Quality control assessment for the PCR diagnosis of tick-borne encephalitis virus infections. *J. Clin. Virol.* **38**, 73–77 (2007)
13. A.M. Kupca, S. Essbauer, G. Zoeller, P.G. de Mendonça, R. Brey, M. Rinder, K. Pfister, M. Spiegel, B. Doerrbecker, M. Pfeffer, G. Dobler, Isolation and molecular characterization of a tick-borne encephalitis virus strain from a new tick-borne encephalitis focus with severe cases in Bavaria, Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* **1**, 44–51 (2010)
14. T.A. Hall, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* **41**, 95–98 (1999)
15. K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar, MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**(10), 2731–2739 (2011)
16. J.D. Thompson, T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D.G. Higgins, The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876–4882 (1997)
17. C.A. Kruse, D.H. Mitchell, B.K. Kleinschmidt-DeMasters, W.A. Franklin, H.G. Morse, E.B. Spector, K.O. Lillehei, Characterization of a continuous human glioma cell line DBTRG-05MG: growth kinetics, karyotype, receptor expression, and tumor suppressor gene analyses. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **28A**, 609–614 (1992)
18. P. Marini, R.A. MacLeod, C. Treuner, G. Bruchelt, W. Böhm, H. Wolburg, P. Schweizer, R. Gierert, SiMa, a new neuroblastoma cell line combining poor prognostic cytogenetic markers with high adrenergic differentiation. *Cancer Genet. Cytogenet.* **112**, 161–164 (1999)
19. J. Burston, H.E. Webb, C.E. Gordon Smith, Neuropathological changes following treatment of human malignant disease with Langat virus. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **26**(3), 511–517 (1967)
20. S. Randolph, Predicting the risk of tick-borne diseases. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**(Suppl 33), 6–10 (2002)
21. J. Suss, C. Schrader, U. Abel, W.P. Voigt, R. Schosser, Annual and seasonal variation of tick-borne encephalitis virus (TBEV) prevalence in ticks in selected hot spot areas in Germany using a nRT-PCR: results from 1997 and 1998. *Zentralbl. Bakteriol.* **289**, 564–578 (1999)
22. J. Suss, C. Schrader, U. Abel, A. Bormane, A. Duks, V. Kalnina, Characterization of tick-borne encephalitis (TBE) foci in Germany and Latvia (1997–2000). *Int. J. Med. Microbiol.* **291**(Suppl 33), 34–42 (2002)
23. V.A. Pakhotina, M.A. Vaitovich, N. Yu Basov, Epidemiological aspects of tick-borne encephalitis in Omsk oblast. *Byull. VSN Ts SO RAMN* **6**, 91–92 (2002)
24. T.S. Gritsun, T.V. Frolova, A.I. Zhankov, M. Armesto, S.L. Turner, M.P. Frolova, V.V. Pogodina, V.A. Lashkevich, E.A. Gould, Characterization of a siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis. *J. Virol.* **77**, 25–36 (2003)
25. T.S. Gritsun, A. Desai, E.A. Gould, The degree of attenuation of tick-borne encephalitis virus depends on the cumulative effects of point mutations. *J. Gen. Virol.* **82**, 1667–1675 (2001)
26. D. Hayasaka, T.S. Gritsun, K. Yoshii, T. Ueki, A. Goto, T. Mizutani, H. Kariwa, T. Iwasaki, E.A. Gould, I. Takashima, Amino acid changes responsible for attenuation of virus neurovirulence in an infectious cDNA clone of the Oshima strain of tick-borne encephalitis virus. *J. Gen. Virol.* **85**(4), 1007–1018 (2004)
27. A.A. Romyantsev, B.R. Murphy, A.G. Pletnev, A tick-borne Langat virus mutant that is temperature sensitive and host range restricted in neuroblastoma cells and lacks neuroinvasiveness for immunodeficient mice. *J. Virol.* **80**(3), 1427–1439 (2006)
28. D. Ruzek, T.S. Gritsun, N.L. Forrester, E.A. Gould, J. Kopecký, M. Golovchenko, N. Rudenko, L. Grubhoffer, Mutations in the NS2B and NS3 genes affect mouse neuroinvasiveness of a Western European field strain of tick-borne encephalitis virus. *Virology* **374**(2), 249–255 (2008)
29. K.D. Yang, W.T. Yeh, R.F. Chen, H.L. Chuon, H.P. Tsai, C.W. Yao, M.F. Shiao, A model to study neurotropism and persistency of Japanese encephalitis virus infection in human neuroblastoma cells and leukocytes. *J. Gen. Virol.* **85**, 635–642 (2004)
30. D. Ruzek, M. Vancova, M. Tesarova, A. Ahantari, J. Kopecky, L. Grubhoffer, Morphological changes in human neural cells following tick-borne encephalitis virus infection. *J. Gen. Virol.* **90**, 1649–1658 (2009)
31. D. Hayasaka, L. Ivanov, G.N. Leonova, A. Goto, K. Yoshii, T. Mizutani, H. Kariwa, I. Takashima, Distribution and characterization of tick-borne encephalitis viruses from Siberia and far-eastern Asia. *J. Gen. Virol.* **82**, 1319–1328 (2001)
32. L.I. Romanova, A.P. Gmyl, T.I. Dzhevanian, D.V. Bakhmutov, A.N. Lukashev, L.V. Gmyl, A.A. Romyantsev, L.A. Burenkova, V.A. Lashkevich, G.G. Karganova, Microevolution of tick-borne encephalitis virus in course of host alternation. *Virology* **362**, 75–84 (2007)
33. S. Ko, J.G. Kang, S.Y. Kim, H.C. Kim, T.A. Klein, S.T. Chong, W.J. Sames, S.M. Yun, Y.R. Ju, J.S. Chae, Prevalence of tick-borne encephalitis virus in ticks from southern Korea. *J. Vet. Sci.* **11**, 197–203 (2010)
34. N. Saitou, M. Nei, The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–425 (1987)
35. J. Felsenstein, Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783–791 (1985)

36. K. Tamura, Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Mol. Biol. Evol.* **9**, 678–687 (1992)
37. S.Y. Kovalev, D.N. Chernykh, V.S. Kokorev, T.E. Snitkovskaya, V.V. Romanenko, Origin and distribution of tick-borne encephalitis virus strains of the Siberian subtype in the Middle Urals, the north-west of Russia and the Baltic countries. *J. Gen. Virol.* **90**, 2884–2892 (2009)
38. E.I. Korenberg, A.A. Pchelkina, L.N. Spitsina, Consistent patterns in the contact of domestic animals with tick-borne encephalitis virus in the eastern part of the Russian plain. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **28**, 73–84 (1984)
39. E.I. Korenberg, A.A. Pchelkina, J.V. Kovalevsky, Contact of birds with tick-borne encephalitis virus in the eastern part of the Russian plain. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **28**, 65–72 (1984)
40. E. Cisak, A. Wojcik-Fatla, V. Zajac, J. Sroka, A. Buczek, J. Dutkiewicz, Prevalence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in samples of raw milk taken randomly from cows, goats and sheep in eastern Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* **17**, 283–286 (2010)
41. J. Waldenstrom, A. Lundkvist, K.I. Falk, U. Garpmo, S. Bergström, G. Lindegren, A. Sjöstedt, H. Mejlon, T. Fransson, P.D. Haemig, B. Olsen, Migrating birds and tickborne encephalitis virus. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 1215–1218 (2007)
42. D. Sumilo, L. Asokliene, A. Bormane, V. Vasilenko, I. Golovljova, S.E. Randolph, Climate change cannot explain the upsurge of tick-borne encephalitis in the Baltics. *PLoS One* **2**, e500 (2007)
43. B. Kriz, C. Benes, M. Daniel, Alimentary transmission of tick-borne encephalitis in the Czech Republic (1997–2008). *Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **58**, 98–103 (2009)
44. K. Tamura, M. Nei, S. Kumar, Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *PNAS* **101**, 11030–11035 (2004)

IV. DISKUSSION

1. Isolierung von TBEV aus Zecken

Im Rahmen der Doktorarbeit gelang es TBEV verschiedener Subtypen aus Zentraleuropa und Sibirien zu isolieren. Über den Zeitraum der Arbeit konnten 16 Viren des Europäischen Subtyps und ein Isolat des Sibirischen Subtyps aus Zecken isoliert werden. Zur Virus-Isolierung wurde TBEV-positives Zeckenmaterial verwendet und auf permanenten Zellkulturen (VeroB4) inkubiert (Publikation 5, Frey et al. 2012).

Es ist gelungen, aus einem einzigen Naturherd in der Oberpfalz (Haselmühl), der als Mikrofokus im Zeitraum von drei Jahren kontinuierlich beprobt wurde, 14 TBEV-Isolate zu gewinnen. Aus zwei weiteren Mikrofoci in der Oberpfalz konnten zwei weitere TBEV aus Zecken isoliert werden (Burglengenfeld und Heselbach). Mit Hilfe dieser neuen TBEV-Isolate des europäischen Subtyps können Infektionsversuche im Maus-Tiermodell durchgeführt werden und neue Erkenntnisse über die Pathogenität von TBEV-Viren aus dem Zentraleuropäischen Raum gewonnen werden. In Vergleichen der Untersuchungsergebnisse mit anderen TBEV-Isolaten aus Europa und Sibirien können dann erstmals Aussagen über die Virulenz von TBEV-Stämme aus Deutschland getroffen werden (Överby et al., Universität Umea, in Bearbeitung).

Bei dem isolierten Virus des Sibirischen Subtyps handelt es sich um ein TBEV, das aus einer Zecke aus der Mongolei isoliert wurde. Basierend auf der Gesamtgenomanalyse und zellbiologischen Versuchen mit diesem Virusisolat (Publikation 5, Frey et al. 2012), werden ebenfalls die Pathogenität des Virus im Maus-Tiermodell untersucht (Överby et al., Universität Umea, in Bearbeitung).

2. Typisierung und Epidemiologie von TBEV

2.1. Vergleich von TBEV basierend auf Nukleotidsequenzen des E-Gens

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden von 2010 bis 2012 für die Subtypisierung von TBE-Viren in Mitteleuropa 38 Stämme aus fünf Ländern (Deutschland, Dänemark, Österreich, Slowakei und Mongolei) molekularbiologisch charakterisiert. Nach der Sequenzbestimmung der E-Gene wurden die Sequenzen

mit bekannten Sequenzen aus dem europäischen Raum verglichen und Stammbäume für phylogenetische Vergleiche erstellt.

2.1.1. Vergleich von TBEV-Stämmen aus Deutschland, Österreich und der Slowakei

Ein Vergleich von insgesamt 102 verfügbaren TBEV-Stämmen aus Deutschland, Österreich, Tschechien und der Slowakei zeigt die Zuordnung von Stämmen aus dem Osten Bayerns in verschiedene Kladen, die mit den Stämmen aus Osteuropa assoziiert sind (Abbildung 8), (Publikation 3, Weidmann et al. 2013). Phylogenetische Analysen des Hüll-Gens zeigen, dass die Stämme im Osten Bayerns im Zeitraum von etwa 300 Jahren aus dem Osten Europas nach Deutschland eingetragen und vor etwa 200 Jahren wieder in den Osten zurückgeführt wurden. Anfang des 20. Jahrhunderts ist eine Rückkehr verschiedener TBEV-Stämme nach Deutschland aus dem Osten zu beobachten. Eine Verbreitung von TBEV aus dem Osten Europas nach Westen wird in weiteren Studien gezeigt (Heinze et al. 2012; Zanotto et al. 1995). Die 102 TBEV-Stämme können in zwei Subkladen A (gelb) und B (grün) eingeteilt werden (Abbildung 8). Für die Stämme der Subklade A aus Asbach, Fürstenstein, Heselbach und Burglengenfeld (Oberpfalz) wird vermutet, dass sie sich unter einer nördlichen Umgehung des Bayerischen Waldes in Richtung Oberpfalz verbreitet haben. TBEV-Stämme aus der Subklade B aus Haselmühl wurden in einer südlichen Umgehung des Bayerischen Waldes entlang der Donau und dann nach Norden in die Oberpfalz eingetragen. Die Verbreitung von TBEV-Stämmen nach Deutschland kommt womöglich über Wanderungen von Wildtieren zustande, die als Virusreservoir oder auch Träger von Zecken in Frage kommen. Weitere Möglichkeiten der TBEV-Verbreitung kann über Zugvögel stattfinden, die von Zecken befallen sind oder zum Beispiel auch durch Haustiere, wie der Hund. Nach Wanderungen oder nach Urlaubsreisen können an den Hunden TBEV-infizierte Zecken anhaften, die zur Verbreitung von TBEV-Stämmen beitragen können (Hoogstraal et al. 1963; Waldenström et al. 2007; Kunze 2008; Kovalev et al. 2009; Pfeffer et al. 2011; Publikation 5, Frey et al. 2012). Sozio-ökonomische Aspekte spielen bei der Verbreitung von Viren ebenfalls eine große Rolle. Zu nennen sind Aspekte wie zum Beispiel der Güter- und Warenverkehr, der durch die Öffnung der Grenzen in den Osten nach den 1990er Jahren zugenommen und so möglicherweise für eine Verbreitung von Wildtieren gesorgt

hat (Fickel et al. 2012). Es wird angenommen, dass diese als Träger von infektiösen Zecken oder als Virusreservoir eine Verbreitung des Virus von Ost nach West bedingten. Außerdem sind Völkerwanderungen als eine mögliche Ursache zu nennen, die durch die Kriege oder Hungersnöte der letzten Jahrhunderte in Europa verursacht wurden. Einhergehend mit den Bevölkerungsab- und zuwanderungen kam es durch die an die Menschen assoziierten Nagetiere, die als Zeckenträger oder als Virusreservoir fungierten, zu einer möglichen Verbreitung von TBEV (Kovalev et al. 2009; Publikation 3, Weidmann et al. 2013). Bemerkenswert ist, dass nach den derzeit verfügbaren Rechenmodellen eine erste Einwanderung des TBEV in Bayern vor 350 Jahren, etwa zur Zeit des Dreißigjährigen Krieges mit großen Völkerwanderungen im ostbayerischen Grenzland, errechnet wurde (Weidmann et al. 2013).

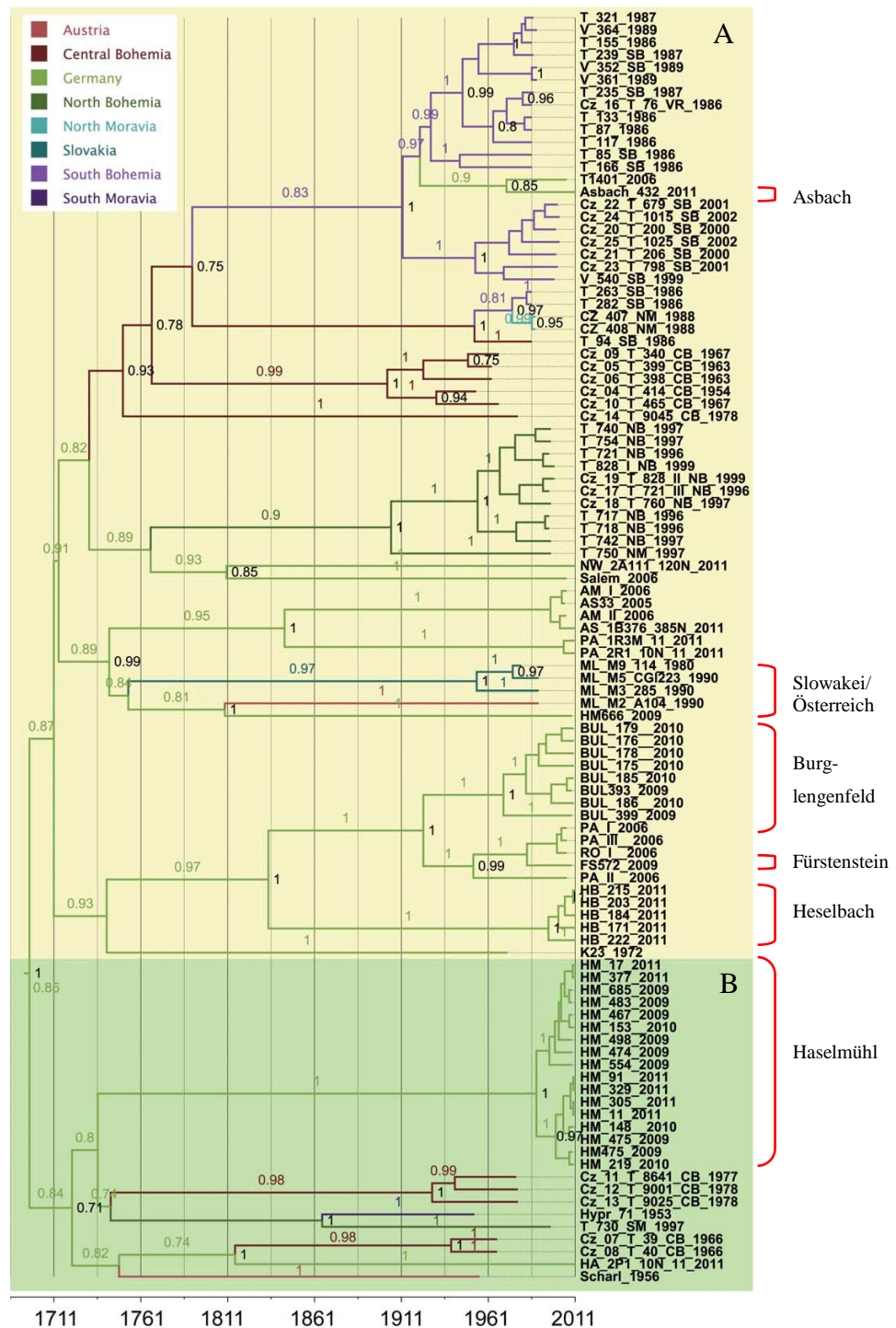


Abbildung 8: Phylogenetischer Stammbaum mit der bayesianischen Analyse von 102 TBEV-Stämmen aus Deutschland, Österreich, Tschechien und Slowakei (Publikation 3, Weidmann et al. 2013). Die 120 TBEV-Stämme können in zwei Subkladen A (gelb) und B (grün) eingeteilt werden. Die 34 Virusstämme, die im Rahmen dieser Doktorarbeit eingebracht wurden, sind rot umklammert und nach ihrer Herkunft beschriftet. Die Analysenmethode errechnete eine Verbreitung der Viren über einen Zeitraum von 350 Jahren. Weitere Informationen zu den TBEV-Stämmen und der Methode sind in der Publikation zu finden (Publikation 3, Weidmann et al. 2013).

2.1.2. Vergleich eines mongolischen TBEV mit TBEV-Stämmen aus Sibirien

Das mongolische Gesundheitswesen und die Surveillance zu TBEV-Erkrankungen befinden sich erst seit wenigen Jahren im Aufbau und werden stark durch die politische Lage im Land beeinflusst. Während einer Expedition in die Mongolei konnten im Jahr 2010 64 Zecken gesammelt werden, wovon zwei Zecken TBEV-positiv getestet wurden. Aus einer der beiden Zecken konnte das gesamte Genom sequenziert und ein Virusstamm isoliert werden (MucAr M14/10), (Publikation 5, Frey et al. 2012).

Phylogenetische Analysen für die Sequenz des 1488 Nukleotide langen E-Gens ergaben die Zuordnung zum sibirischen Subtyp des TBEV. Über Vergleiche mit Sequenzen aus der Genbank konnte die größte Übereinstimmung mit Sequenzen eines sibirischen Stammes aus Irkutsk gefunden werden. Die Übereinstimmung ergab 96,7% auf Nukleotidebene und 99,5% auf Aminosäurenebene (Publikation 5, Frey et al. 2012).

Der sibirische Subtyp des TBEV kann im phylogenetischen Stammbaum der E-Gene in zwei Unterkladen eingeteilt werden. In einer Unterklade clustern Virusstämme aus Westsibirien und in der anderen Unterklade die TBEV-Stämme aus Ostsibirien (Publikation 5, Frey et al. 2012). In der Literatur wird beschrieben, dass die Einteilung der beiden Unterkladen wahrscheinlich aufgrund zweier Aminosäureaustausche an den Positionen 234 und 431 zurückzuführen ist (Gritsun et al. 2001; Gritsun et al. 2003). Das mongolische MucAr M14/10 weist als einziges bisher bekanntes TBEV geteilte Eigenschaften in den Aminosäureaustauschen 234 und 431 auf und kann dadurch weder klar den ostsibirischen Stämmen, noch den westsibirischen TBEV-Stämmen zugeordnet werden. Die bisher angenommene eindeutige Unterteilung in west- und ostsibirischen TBEV-Stämmen kann Aufgrund unserer Ergebnisse nicht bestätigt werden (Publikation 5, Frey et al. 2012).

Die Verbreitung des TBEV sibirischen Subtyps in die Mongolei kann auf zwei Wegen erfolgt sein. Ein möglicher Weg ist eine Verbreitung entlang der transsibirischen Route über die transsibirische Eisenbahn oder das Fernstraßennetz (Kovalev et al. 2009). Für diese Möglichkeit der Verbreitung spricht, dass das MucAr M14/10-Virus mit TBEV-Stämmen im phylogenetischen Stammbaum clustert, die ihre Verbreitung ebenfalls entlang der transsibirischen

Route haben (Publikation 5, Frey et al. 2012). Die zweite Möglichkeit der Virusverbreitung besteht über den Vogelzug von China über die Mongolei an den Baikalsee und zurück. Vogelzug als Verbreitungsmöglichkeit von TBEV-positiven Zecken entlang der Flugrouten wurde bisher in verschiedensten Publikationen beschrieben und könnte eine weitere Möglichkeit sein, wie das TBEV sibirischen Subtyps in die Mongolei gelangt ist (Korenberg et al. 1984; Waldenström et al. 2007; Publikation 5, Frey et al. 2012; Publikation 1, Frey et al. 2013b).

Von einer weiteren Expedition im Juli 2013 wurden 1600 Zecken nach Deutschland gebracht und werden derzeit auf TBEV untersucht. Von 616 bisher untersuchten Zecken wurden 15 TBEV-positiv getestet und deren E-Gene werden zum gegenwärtigen Zeitpunkt sequenziert (unpublizierte Ergebnisse). Die folgenden Ergebnisse versprechen eine umfangreiche Datensammlung, die die Erkenntnisse von TBEV in der Mongolei zu einem neuen Sachstand in puncto Surveillance und Epidemiologie führen werden.

2.1.3. Vergleich eines dänischen TBEV-Stammes mit skandinavischen TBEV-Stämmen

In den skandinavischen Ländern nimmt die Anzahl an TBE-Fällen zu und TBEV breitet sich geographisch weiter aus (Jääskeläinen et al. 2011). In Dänemark wurde in den 1950er Jahren zum ersten Mal über TBE von der Insel Bornholm berichtet. Es gab damals etwa vier Krankheitsfälle bezogen auf 100.000 Personen. Nach dem erstmaligen Auftreten der TBE auf dem Festland Dänemarks (Zealand) in den Jahren 2008 und 2009 (Fomsgaard et al. 2009), wurden in verschiedenen Regionen Dänemarks Zecken gesammelt und auf TBEV getestet. Im Rahmen dieser Studie konnte ein TBEV E-Gen sequenziert werden (Publikation 4, Fomsgaard et al. 2013). Die phylogenetischen Analysen des Hüll-Gens ergaben für das Dänische TBEV eine Eingruppierung in eine Unterklade mit zwei schwedischen TBEV-Stämmen (Abbildung 9). Diese Eingruppierung des neuen TBEV in Dänemark aus dem Jahr 2011 scheint sehr eng mit der Verbreitung der Viren durch Wildtiere assoziiert zu sein. In Schweden wurde im Laufe der letzten zwei Jahrzehnte eine Zunahme der Rehpopulation und damit eine Zunahme der Zeckenpopulation beobachtet (Jaenson et al. 2012). Eine Verbreitung der Tiere in

Richtung Südwesten Schwedens war zu beobachten, was auch dazu geführt haben könnte, dass das Virus in den an den Rehen anhaftenden Zecken vom Süden Schwedens nach Dänemark gelangt ist (Publikation 4, Fomsgaard et al. 2013). Das neu entdeckte Virus aus Dänemark gruppiert im phylogenetischen Stammbaum direkt mit schwedischen TBEV-Stämmen (Abbildung 9) und nicht mit dem lange bekannten TBEV aus Bornholm.

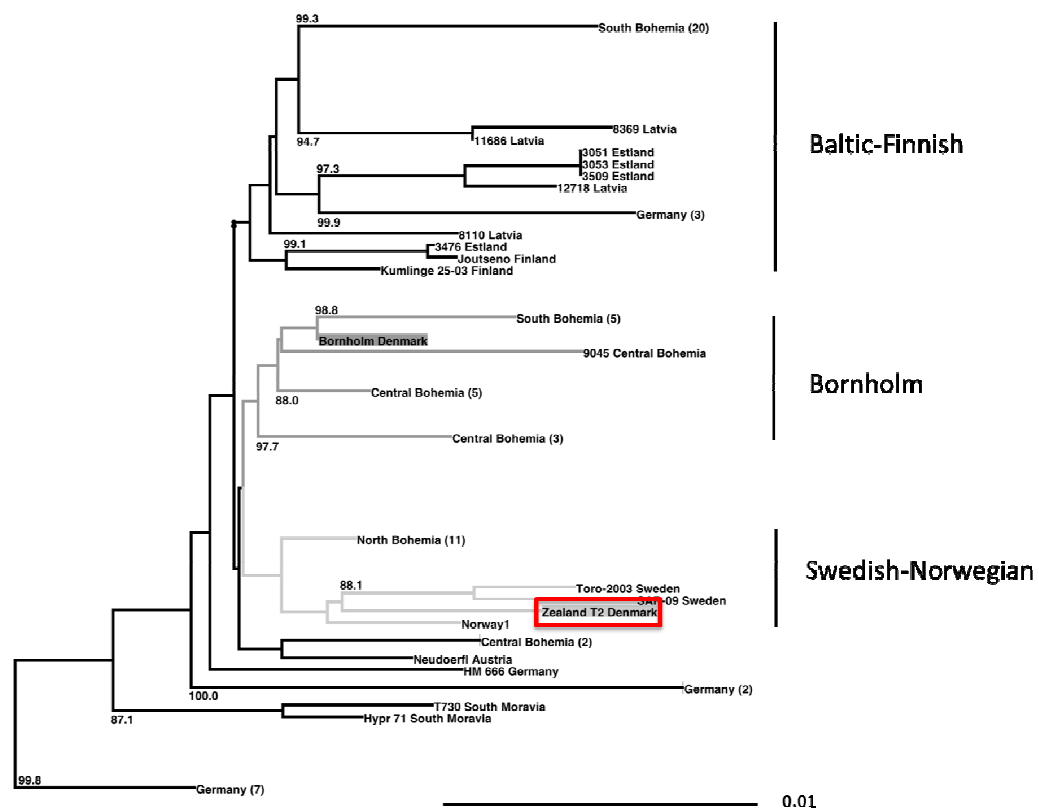


Abbildung 9: Stammbaum basierend auf dem 1488 nt langen Gen für das E-Protein (Publikation 4, Fomsgaard et al. 2013). Der dänische TBEV-Stamm Zealand T2 (rot markiert) gruppiert in einer Klade mit TBEV-Stämmen aus Schweden und Norwegen. Der Stammbaum wurde in Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) nach der Neighbour Joining Methode erstellt, 1000 Bootstraps. Weitere Informationen zu den TBEV-Stämmen und der Methode sind in der Publikation zu finden (Publikation 4, Fomsgaard et al. 2013).

In diesen Analysen zeigt sich ebenfalls, dass die Verbreitung von TBEV in den skandinavischen Ländern im ständigen Fluss ist und eng mit der Wanderung von Tieren oder anthropogenen Faktoren zu tun hat. Für detailliertere Analysen zur genauen Verbreitung sind mehr Informationen zu TBEV-Mikrofoci und deren assoziierten TBEV-Stämmen aus Nord- und Südsandinavien nötig.

2.2. Sequenzierung von TBEV-Gesamtgenomen aus der Slowakei, Österreich und der Mongolei

Für die Typisierung von TBEV in ausgewählten Ländern konnten für fünf neue Stämme aus drei Ländern das Gesamtgenom sequenziert und charakterisiert werden (ein Stamm aus Österreich, drei Stämme aus der Slowakei und ein Stamm aus der Mongolei).

2.2.1. Epidemiologie von TBEV-Stämmen aus der Slowakei

Basierend auf der umfangreichen Stammsammlung von Milan Labuda war es möglich, von drei TBEV-Isolaten aus der Slowakei das Gesamtgenom zu sequenzieren. Zwei der Stämme, 285 (KC835595) und 114 (KC835596), wurden aus Zecken (*Ixodes ricinus*) und ein Stamm CGI223 (KC835597) aus dem Gehirn einer Rötelmaus (*Myodes glareolus*) isoliert. Interessant ist bei diesen Stämmen, die aus unterschiedlichen Wirten stammen, der Vergleich, ob das TBEV Virus aus unterschiedlichen Tierspezies unterschiedliche Sequenzen aufweist und somit wirtsspezifisch sein könnte. Ein weiterer Aspekt ist, dass aus der Slowakei bis dahin keine Daten über TBEV Gesamtgenome existieren (Publikation 1, Frey et al. 2013b).

Ein Vergleich der drei Sequenzen zeigt eine hohe Sequenzhomologie von mehr als 99,5% auf Nukleotidebene. Vergleicht man die drei Stämme auf Aminosäurenebene, so findet man in den Polyproteinen von 3400 Aminosäuren Länge nur drei Aminosäurenunterschiede (Publikation 1, Frey et al. 2013b). Die Aminosäurenunterschiede befinden sich im NS2a- und im NS4b-Protein, deren Funktion im TBEV bislang noch nicht abschließend geklärt ist. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz des Polyprotein von TBEV CGI223, das aus dem Gehirn einer Rötelmaus isoliert wurde und der TBEV-Aminosäuresequenz des Polyprotein des Zeckenisolat 114 weisen eine höhere Identität auf, als ein Vergleich der beiden TBEV-Aminosäuresequenzen der beiden Zeckenisolate 285 und 114 untereinander. Basierend auf diesem Vergleich kann angenommen werden, dass es in Zecken und Rötelmäusen vermutlich keine wirtsspezifische Selektion im TBEV-Gesamtgenomen gibt. Dies muss allerdings noch durch weitere Sequenzierungen von TBEV-Gesamtgenomen in unterschiedlichen Wirten bestätigt werden. Kritisch zu bewerten ist hier, dass vor der Sequenzierung jedes der Isolate unterschiedlich oft in Gehirnen von Babymäusen passagiert wurde und somit eine Anpassung der Stämme an die neuronalen Babymauszellen

stattgefunden haben könnte. Der Stamm 285 wurde dreimal, der Stamm 114 neunmal im Gehirn einer Babymaus passagiert, beide Isolate stammen ursprünglich aus Zecken. Der Stamm CGI223, ursprünglich aus dem Gehirn einer Rötelmaus (*Myodes glareolus*) isoliert, wurde fünfmal im Gehirn einer Babymaus passagiert (Publikation 1, Frey et al. 2013b).

Im phylogenetischen Stammbaum der Gesamtgenome liegen alle drei Slowakischen TBEV-Stämme in einer Klade, die eine nahe Verwandtschaft mit dem deutschen Stamm aus Amberg, AS33 (GQ266392) und dem österreichischen Stamm A104 (KF151173), aufweist (Abbildung 10). Hier ist ein Unterschied zwischen dem Stammbaum der E-Gene, der als Standard zur phylogenetischen Eingruppierung für TBEV-Stämme gilt und dem Stammbaum der Gesamtgenome zu erkennen (Abbildung 8), (Publikation 3, Weidmann et al. 2013). Im phylogenetischen Stammbaum der E-Gene zeigt sich neben der nahen Verwandtschaft mit dem österreichischen TBEV-Stamm A104 (KF151173) und dem deutschen TBEV-Stamm Haselmühl HM666 (JF501452), dass der Stamm AS33 in einer anderen Klade liegt. Im Stammbaum der Gesamtgenome gruppiert der Stamm A104 zusammen mit AS33 (Abbildung 10), (Publikation 2, Frey et al. 2013a). Zu diskutieren ist, dass ein Genomabschnitt wie das E-Gen nur einen Teil des Virus-Gesamtgenoms vertritt und damit auch nur eine Art „Fingerabdruck“ sein kann. Ein Gesamtgenom repräsentiert den kompletten kodierenden und nicht-kodierenden Bereich und bietet letztendlich ein Maximum an Informationen, die zur Erstellung eines genauen Stammbaumes unerlässlich sind. Die führt zu einer viel „schärferen“ Auftrennung innerhalb der TBEV-Stämme in phylogenetischen Stammbäumen. In einer Zeit in der durch Next-Generation Sequencing Gesamtgenome im Hochdurchsatz-Verfahren erstellt werden können, sollten Gesamtgenome als Mittel der Wahl für phylogenetische Bestimmungen herangezogen werden. Hierfür sind jedoch noch mehr TBEV-Gesamtgenomsequenzen nötig, denn für umfangreiche Vergleiche von TBEV-Stämmen gibt es derzeit noch zu wenige Gesamtgenome, die in die Genomdatenbank eingestellt sind (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>).

Innerhalb der Slowakei konnte im Vergleich der regionalen Verbreitung von den drei TBEV festgestellt werden, dass die beiden Stämme, die am weitesten geographisch voneinander entfernt isoliert wurden, am engsten miteinander verwandt sind (Stamm CGI223 und 114), (Abbildung 10), (Publikation 1, Frey et

al. 2013b). Die wahrscheinlichste Erklärung über die weite geographische Distanz dieser beiden Stämme innerhalb der Slowakei ist der Vogelzug (Spitalská et al. 2006; Geller et al. 2013). Die Möglichkeit der TBEV-Verbreitung von der Zahorska-Ebene zur Donau-Ebene entlang von Flusstälern, Eisenbahnschienen oder Autobahnen ist geographisch eher unwahrscheinlich (Publikation 1, Frey et al. 2013b). Zwischen diesen beiden Ebenen, aus denen die beiden TBEV isoliert wurden, liegen die kleinen Karpaten (Höhe 768m).

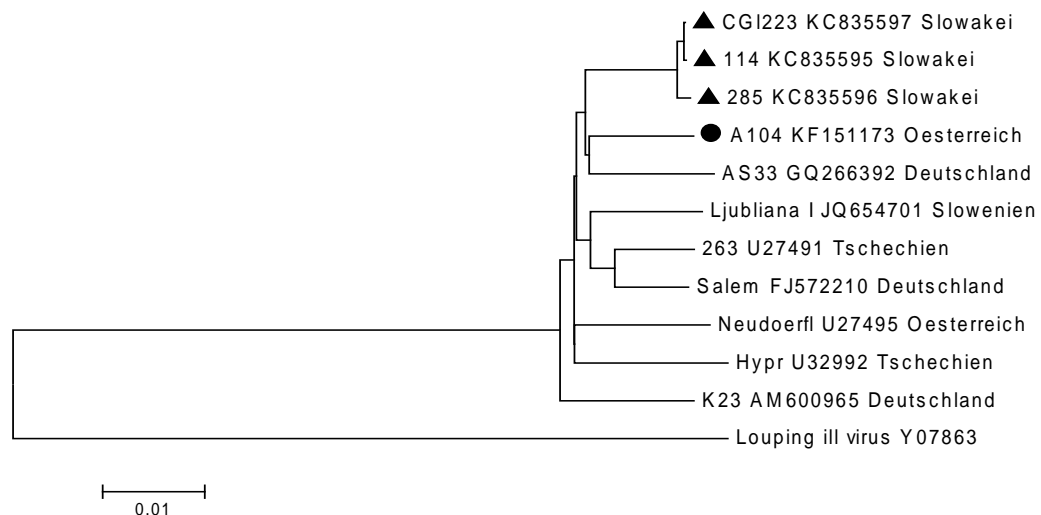


Abbildung 10: Phylogenetischer Stammbaum aller verfügbaren Gesamtgenome aus Zentraleuropa, basierend auf elf TBEV-Gesamtgenomsequenzen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>). Die drei Slowakischen Sequenzen (CGI223, 114 und 285) sind mit einem Dreieck markiert, das Österreichische TBEV-Virus A104 mit einem Kreis. Das österreichische Virus A104 clustert in einer Subklade mit dem deutschen Stamm AS33 (Publikation 2, Frey et al. 2013a). Für die Erstellung des Stammbaumes wurde MEGA 5 (www.megasoftware.net) verwendet, Neighbour Joining, 1000 bootstraps.

2.2.2. Epidemiologie eines TBEV-Stamms aus Österreich

Aus Österreich war bis zur Erstellung dieser Doktorarbeit nur eine Gesamtgenom-Sequenz erhältlich. Hierbei handelt es sich um das Gesamtgenom des Referenzstammes für niedrigpathogene TBEV-Stämme des europäischen Subtyps, Neudoerfl (U27495). Dieser TBEV-Stamm wurde 1971 aus einer Zecke aus dem Burgenland isoliert (Wallner et al. 1996). Mit der Gesamtgenom-Sequenzierung des Stammes A104 (KF151173), isoliert aus dem Gehirn einer Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*) ist nun von einem weiteren TBEV-Stamm aus Österreich das Gesamtgenom bekannt. Ein Vergleich der beiden Sequenzen zeigt eine Sequenzhomologie von 97,6% auf Nukleotidebene. Vergleicht man die beiden Stämme auf Aminosäurenebene, so findet man einen Aminosäurenunterschied von

32 Aminosäuren (Publikation 2, Frey et al. 2013a). Vergleicht man das Gesamtgenom in einem phylogenetischen Stammbaum (Abbildung 10) so zeigt sich, dass der österreichische Stamm A104 aus Wagnitz viel näher mit dem Stamm Amberg AS33 (GQ266392) verwandt ist, als mit dem österreichischen Referenzstamm Neudoerfl. Die Ergebnisse der beiden österreichischen Gesamtgenome zeigen, dass zwei Stämme, die geographisch dicht beieinander liegen (Distanz 144km), nicht phylogenetisch nahe Verwandtschaft zeigen müssen (Fajs et al. 2012; Publikation 1, Frey et al. 2013b; Publikation 3, Weidmann et al. 2013).

2.2.3. Epidemiologie eines TBEV-Stamms aus der Mongolei

Das im Rahmen dieser Arbeit publizierte Gesamtgenom des Mongolischen MucAr M14/10 (JQ429588) ist das erste Gesamtgenom, das aus einer TBEV-positiven Zecke (*Ixodes persulcatus*) aus der Mongolei sequenziert wurde. Bis zu dem Zeitpunkt der Veröffentlichung waren zwei genomische Fragmente des Hüllproteins sequenziert und in der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) veröffentlicht (HM133639 und HM133640), (Khasnatinov et al. 2010).

Ein Vergleich des Gesamtgenoms des mongolischen TBEV MucAr M14/10 mit dem sibirischen Subtyp Referenzstamm Vasilchenko (AF069066) zeigt eine Sequenzhomologie von 94% auf der Nukleotidebene und ein Unterschied von 22 Aminosäuren führt zu einer Homologie von 99% der beiden Stämme auf Aminosäurenebene (Publikation 5, Frey et al. 2012). Die größte Verwandtschaft ist zum Stamm Zausaev (AF527415) zu erkennen (Abbildung 11) (Publikation 5, Frey et al. 2012). Es existiert eine Sequenzhomologie der beiden Stämme von 97% auf der Nukleotidebene und 99% auf Aminosäurenebene. Vergleicht man das mongolische Gesamtgenom in einem phylogenetischen Stammbaum mit anderen Gesamtgenomen verschiedenster Subtypen zeigt sich, dass das mongolische MucAr M14/10 dem Sibirischen Subtyp der TBEV zuzuordnen ist (Publikation 5, Frey et al. 2012).

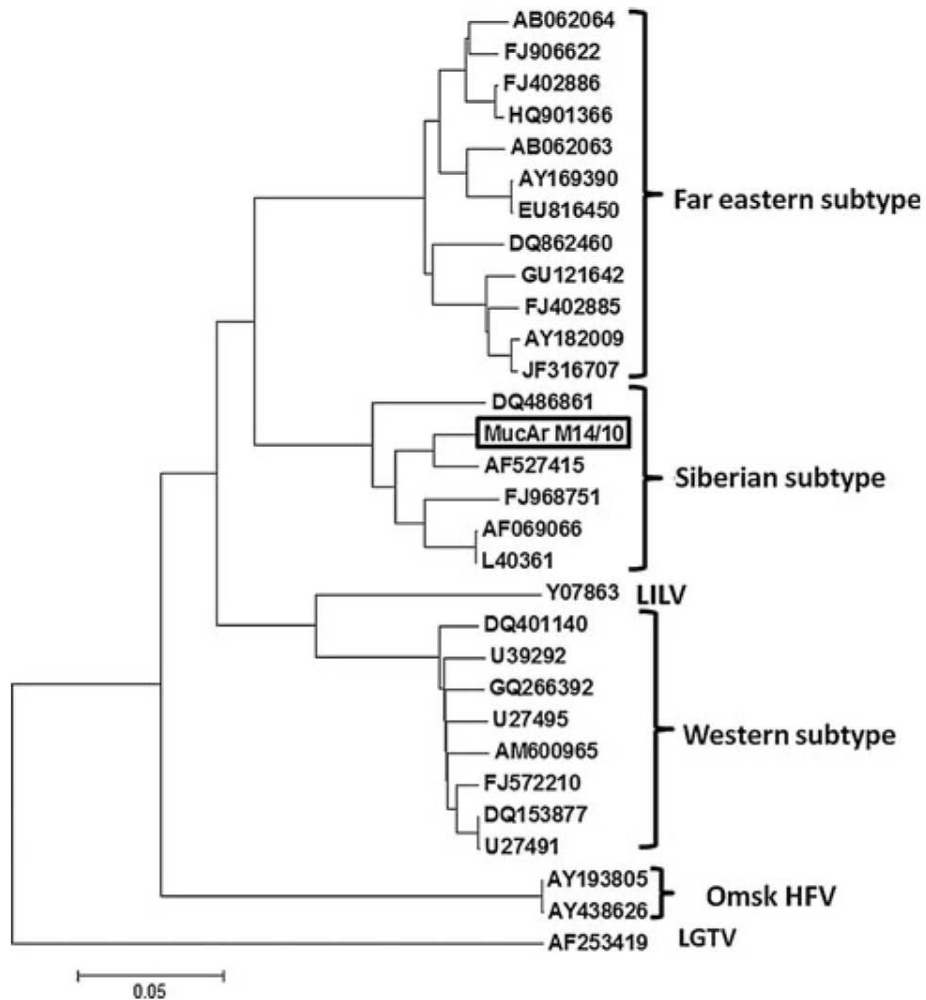


Abbildung 11: Phylogenetischer Stammbaum basierend auf 31 Gesamtgenomsequenzen von TBEV-Stämmen verschiedenster Subtypen (Publikation 5, Frey et al. 2012). Für die Erstellung des Stammbaumes wurde MEGA 5 (www.megasoftware.net) verwendet, Neighbour Joining, 1000 bootstraps. Das Mongolische Virus MucAr M14/10 (umrandet) clustert in der Klade es Sibirischen Subtyps. Erläuterungen zu den Abkürzungen der TBEV-Stämmen unter Publikation 5, Frey et al. 2012.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnten in den Jahren von 2010 bis 2012 38 TBEV-Stämme aus fünf verschiedenen europäischen und asiatischen Ländern (Deutschland, Dänemark, Österreich, Slowakei und Mongolei) mittels Primer-walking neu charakterisiert werden. Diese Stämme wurden auf Basis von subgenomischen Fragment-Analysen sowie Gesamtgenomanalysen typisiert und phylogenetische Vergleiche durchgeführt. Als ein Ergebnis der phylogenetischen Fragment-Analysen des Hüll-Gens, nach der Methode Bayesianischer Statistik, konnte für 102 europäische TBEV-Stämme gezeigt werden, dass sie sich über einen Zeitraum von 350 Jahren in zwei großen Linien verbreitet haben. Phylogenetische Analysen haben ergeben, dass die verschiedenen TBEV-Stämme nördlich und südlich des Bayerischen Waldes aus der Tschechischen und Slowakischen Republik nach Deutschland eingeschleppt wurden.

Für die Verbreitung der TBEV-Stämme wurde die Hypothese aus früheren Arbeiten gestärkt, dass Wanderungen von Wildtieren entlang von Flüssen und Tälern, die als Virusreservoir oder auch Träger von Zecken in Frage kommen, für die Verbreitung des Virus verantwortlich sein können. Ebenso können Zugvögel TBEV verbreiten. Zur Brutzeit können die Vögel im Nest von TBEV-infizierten Zecken gestochen werden und diese später entlang ihrer Flugrouten verbreiten. In dieser Arbeit wird eine umfassende Literaturzusammenfassung über den aktuellen Stand zur Verbreitung von TBEV-Infektionen in Tieren gegeben.

Bei der Verbreitung von TBEV spielen auch der Mensch und sozio-ökonomische Aspekte eine große Rolle. Hier ist das geänderte Freizeit- oder Reiseverhalten der Menschen zu nennen, die bei Reisen in den Osten Europas gerne ihre Haustiere mitführen, die als möglicher Träger von TBEV-infizierten Zecken fungieren. Aber auch durch den gestiegenen Güterfernverkehr kann eine Verbreitung von Nagetieren stattfinden, die als Träger infektiöser Zecken oder als Virusreservoir das Virus entlang der Fernrouten verteilen können. In der Vergangenheit waren auch Völkerwanderungen, verursacht durch Kriege oder Hungersnöte im Europa der letzten Jahrhunderte, für eine mögliche Verbreitung von TBEV verantwortlich.

Im Zusammenhang mit den gewonnenen Sequenz-Daten aus der Slowakei, Österreich und der Mongolei konnten auch frühere Hypothesen bestätigt werden, dass TBEV-Stämme, die geringe Unterschiede in ihrer genetischen Diversität aufweisen, durchaus eine große geographische Distanz haben können und nicht aus derselben Region kommen müssen.

In dieser Arbeit wurde die Frage, ob es wirtsspezifische Unterschiede von TBEV-Sequenzen gibt, erstmals beantwortet. Sequenzvergleiche von TBEV-Gesamtgenomsequenzen aus einer Rötelmaus und einer Zecke aus der Slowakei zeigten, dass beide Sequenzen auf Aminosäureebene identisch waren. Basierend auf diesem Ergebnis wird exemplarisch demonstriert, dass es möglicherweise keine Wirtsunterschiede von TBEV-Gesamtgenomen zwischen Zecken und Rötelmaus gibt.

Im Rahmen der in der Doktorarbeit durchgeführten Arbeiten wurden 16 TBEViren des Europäischen Subtyps und ein Isolat des Sibirischen Subtyps aus Zecken und Nagetieren isoliert. Teile dieser Isolate werden derzeit im Maus-Tiermodell auf ihre Pathogenität untersucht, damit neben den phylogenetischen Ergebnissen ein ganzheitliches Bild der TBEV-Stämme geschaffen werden kann.

Zusammenfassend ist es in dieser Arbeit gelungen, das Wissen über die Herkunft und Verbreitung von TBEV in Europa und der Mongolei wesentlich zu erweitern. Sie liefert damit die Grundlage für viele weitere Studien, um das noch lückenhafte Bild über TBEV zu schließen.

VI. SUMMARY

Within this doctoral thesis during the years from 2010 to 2012, 38 TBEV strains from five different European and Asian countries (Germany, Denmark, Austria, Slovakia and Mongolia) could be characterized by primer-walking. These strains were typed on the basis of sub-genomic fragment analyses as well as complete genome analyses and phylogenetic comparisons. Phylogenetic fragment analyses of the E-gene would be performed by Bayesian analysis. They could be shown for 102 European TBEV strains that they have spread over a time period of 350 years in two main lineages. Phylogenetic analyses indicated that the TBEV strains were spread along two routes to the north and the south of the Bavarian Forest to Germany originating from the Czech Republic and the Slovakian Republic.

For the spreading of the TBEV strains a hypothesis from former workers was confirmed. The migration of wild animals which are a possible virus reservoir or also can carry ticks along from rivers and valleys might be responsible for the spreading of the virus. Also migrating birds may spread TBEV. At the breeding season the birds can be stung in their clutch by TBEV-infected ticks and transmit the ticks later along their migration routes. In this doctoral thesis a comprehensive literature summary above the current knowledge about TBEV in animal was performed.

In the spreading of TBEV, humans also can play an important role regarding socio-economic aspects. Here the changed leisure or travel behavior of people may be one aspect. These might carry their domestic animals along travelling routes in the Eastern part of Europe which act then as a possible bearer of TBEV infected ticks. But also rising transport of goods may be a driver of spread of TBEV. With trucks or on railways rodents might be transported which can distribute the TBEV along the long distant routes and might serve as a shuttle for infectious ticks or as a virus reservoir.

Past migrations in Europe, caused by wars or hunger crisis of the last centuries might also be responsible for the spreading of TBEV.

Sequence data from Slovakia, Austria and Mongolia support hypotheses that TBEV strains originating from far geographic distance show few genetic differences.

In this thesis the question whether there are host-specific differences of TBEV sequences was also investigated. Sequence comparisons of complete genome sequences of TBEV from a bank vole and a tick from Slovakia revealed that both sequences were identical at amino acid level. Based on this result it was shown that there are potentially no host-specific differences in TBEV complete genomes from ticks and bank vole.

Within the scope of carried out work packages of the doctoral thesis 16 TBE viruses of the European subtype and one isolate of the Siberian subtype were isolated from ticks and rodents. Some of the isolates are presently investigated in a mouse model regarding their pathogenicity. These data will beside the phylogenetic results give a comprehensive overview on properties of the TBEV strains in the future.

Summarized, in this PhD thesis the knowledge about the origin and spreading of TBEV in Europe and Mongolia was increased, therefore, this work also enables many further studies in order to fill the gap of knowledge on TBEV.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Achazi K, Růžek D, Donoso Mantke O, Schlegel M, Ali HS, Wenk M, Schmidt-Chanasit J, Ohlmeyer L, Rühle F, Vor T, Kiffner C, Kallies R, Ulrich RG, Niedrig M. Rodents as sentinels for the prevalence of tick-borne encephalitis virus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011 Jun;11(6):641-7.

Aspöck H, Dobler G. Durch Arthropoden übertragene Viren – Steckbrief und Überblick. In: *Krank durch Arthropoden*. 1. Aufl: 2010: 457-466.

Balogh Z, Egyed L, Ferenczi E, Bán E, Szomor KN, Takács M, Berencsi G. Experimental infection of goats with tick-borne encephalitis virus and the possibilities to prevent virus transmission by raw goat milk. *Intervirology.* 2012;55(3):194-200.

Balogh Z, Ferenczi E, Szeles K, Stefanoff P, Gut W, Szomor KN, Takacs M, Berencsi G. Tick-borne encephalitis outbreak in Hungary due to consumption of raw goat milk. *J Virol Methods.* 2010 Feb;163(2):481-5.

Bardos V, Brezina, Hympan J, Kmety E, Kratochvil J, Libikova H, Macicka O, Milosovicova A, Rosicky B, Somodska V. A complex survey of infection foci in Eastern Slovakia in 1953. *Bratisl Lek Listy.* 1954 Oct-Nov;34(10-11):1166-95.

Billoir F, de Chesse R, Tolou H, de Micco P, Gould EA, de Lamballerie X. Phylogeny of the genus flavivirus using complete coding sequences of arthropod-borne viruses and viruses with no known vector. *J Gen Virol.* 2000 Sep;81 Pt 9:2339.

Blaskovic D. Antibodies against viruses encephalitis A and B; concerning the population of Slovakia in non epidemic period. *Cas Lek Cesk.* 1949;88(34):976-9.

Bollati M, Alvarez K, Assenberg R, Baronti C, Canard B, Cook S, Coutard B, Decroly E, de Lamballerie X, Gould EA, Grard G, Grimes JM, Hilgenfeld R,

Jansson AM, Malet H, Mancini EJ, Mastrangelo E, Mattevi A, Milani M, Moureau G, Neyts J, Owens RJ, Ren J, Selisko B, Speroni S, Steuber H, Stuart DI, Unge T, Bolognesi M. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design. *Antiviral Res.* 2010;87(2):125-48.

Borčić B, Raos B, Kranzelić D, Abu Eldan J, Filipović V. The role of large wildlife in the maintenance of natural foci of tick-borne meningoencephalitis in northern Croatia. *Acta Med Iugosl.* 1990;44(4):399-406.

Brinton MA, Dispoto JH. Sequence and secondary structure analysis of the 5'-terminal region of flavivirus genome RNA. *Virology.* 1988;162(2):290-9.

Bröker M, Gniel D. New foci of tick-borne encephalitis virus in Europe: consequences for travelers from abroad. *Travel Med Infect Dis.* 2003;1(3):181-184.

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol.* 1990;44:649-88.

Charrel RN, Attoui H, Butenko AM, Clegg JC, Deubel V, Frolova TV, Gould EA, Gritsun TS, Heinz FX, Labuda M, Lashkevich VA, Loktev V, Lundkvist A, Lvov DV, Mandl CW, Niedrig M, Papa A, Petrov VS, Plyusnin A, Randolph S, Süß J, Zlobin VI, de Lamballerie X. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2004 Dec;10(12):1040-55.

Chunikhin SP. Experimental research on the ecology of the tick-borne encephalitis virus. *Vopr Virusol.* 1990;35(3):183-8.

Cisak E, Wójcik-Fatla A, Zając V, Sroka J, Buczek A, Dutkiewicz J. Prevalence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in samples of raw milk taken randomly from cows, goats and sheep in eastern Poland. *Ann Agric Environ Med.* 2010 Dec;17(2):283-6.

Cleaves GR, Dubin DT. Methylation status of intracellular dengue type 2 40 S RNA. *Virology*. 1979 Jul 15;96(1):159-65.

Cook S, Holmes EC. A multigene analysis of the phylogenetic relationships among the flaviviruses (Family: *Flaviviridae*) and the evolution of vector transmission. *Arch Virol*. 2006 Feb;151(2):309-25.

Danielová V, Holubová J, Pejcoch M, Daniel M. Potential significance of transovarial transmission in the circulation of tick-borne encephalitis virus. *Folia Parasitol (Praha)*. 2002;49(4):323-5.

Denk H, Kovac W. Die experimentelle Frühsommer-Encephalitis (FSEM) der weißen Maus. *Acta Neuropathol (Berl)* 1966;7:162-174.

Dobler G, Hufert FT, Pfeffer M, Essbauer S. Tick-borne encephalitis: From Microfocus to Human Disease. In: H. Mehlhorn (Hrsg.): *Progress in Parasitology. Reviews on occasion of the 50th anniversary of the German Society of Parasitology – Düsseldorf University Press*. 2011.

Dobler G. Zoonotic tick-borne flaviviruses. *Vet Microbiol*. 2010 Jan 27;140(3-4):221-8.

Doherty PP, Smith W, Reid HW. Louping-ill encephalomyelitis in the sheep. V. Histopathogenesis of the fatal disease. *J Comp Pathol*. 1972 Jul;82(3):337-44.

Donoso Mantke O, Escadafal C, Niedrig M, Pfeffer M, Working Group For Tick-Borne Encephalitis Virus C. Tick-borne encephalitis in Europe, 2007 to 2009. *Euro Surveill*. 2011 Sep 29;16(39).

Ecker M, Allison SL, Meixner T, Heinz FX. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J Gen Virol*. 1999 Jan;80 (Pt 1):179-85.

Fajs L, Durmiši E, Knap N, Strle F, Avšič-Županc T. Phylogeographic characterization of tick-borne encephalitis virus from patients, rodents and ticks in Slovenia. PLoS One. 2012;7(11):e48420.

Fickel J, Bubliy O, Stache A, Noventa T, Jirsa J, Heurich M. Crossing the border? Structure of the red deer (*Cervus elaphus*) population from the Bavarian-Bohemian forest ecosystem. Mamm Biol. 2012;77, 211-220.

Fomsgaard A, Christiansen C, Bodker R. First identification of tick-borne encephalitis in Denmark outside of Bornholm, August 2009. Euro Surveill. 2009 Sep 10;14(36).

Fomsgaard A, Fertner ME, Essbauer S, Nielsen AY, Frey S, Lindblom P, Lindgren PE, Bodker R, Weidmann M, Dobler G. Tick-borne encephalitis virus, Zealand, Denmark, 2011. Emerg Infect Dis. 2013 Jul;19(7):1171-3.

Freundt EA. Endemic occurrence in Bornholm of Central European virus meningo-encephalitis transmitted by ticks. Ugeskr Laeger. 1963 Aug 9;125:1098-104.

Frey S, Essbauer S, Zöller G, Klempa B, Dobler G, Pfeffer M. Full genome sequences and preliminary molecular characterization of three tick-borne encephalitis virus strains isolated from ticks and a bank vole in Slovak Republic. Virus Genes. 2013b doi: 10.1007/s11262-013-0985-0.

Frey S, Essbauer S, Zöller G, Klempa B, Weidmann M, Dobler G, Pfeffer M. Complete Genome Sequence of Tick-Borne Encephalitis Virus Strain A104 Isolated from a Yellow-Necked Mouse (*Apodemus flavicollis*) in Austria. Genome Announc. 2013a Aug 8;1(4).

Frey S, Mossbrugger I, Altantuul D, Battsetseg J, Davaadorj R, Tserennorov D, Buyanjargal T, Otgonbaatar D, Zöller L, Speck S, Wölfel R, Dobler G, Essbauer S. Isolation, preliminary characterization, and full-genome analyses of tick-borne encephalitis virus from Mongolia. Virus Genes. 2012 Dec;45(3):413-25.

Frimmel S, Krienke A, Riebold D, Löbermann M, Littmann M, Fiedler K, Klaus C, Süss J, Reisinger EC. Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus bei Menschen und Zecken in Mecklenburg-Vorpommern. Dtsch Med Wochenschr. 2012 Jul;135(27): 1393-6.

Geller J, Nazarova L, Katargina O, Leivits A, Järvekülg L, Golovljova I. Tick-borne pathogens in ticks feeding on migratory passerines in Western part of estonia. Vector Borne Zoonotic Dis. 2013 Jul;13(7):443-8.

Gelpi E, Preusser M, Garzuly F, Holzmann H, Heinz FX, Budka H. Visualization of Central European tick-borne encephalitis infection in fatal human cases. J Neuropathol Exp Neurol. 2005 Jun;64(6):506-12.

Gerth HJ, Grimshandl D, Stage B, Döller C, Kunz C. Roe deer as sentinels for endemicity of tick-borne encephalitis virus. Epidemiol Infect. 1995 Oct;115(2):355-65.

Gould EA, Solomon T. Pathogenic flaviviruses. Lancet. 2008 Feb 9;371(9611):500-9.

Grard G, Moureau G, Charrel RN, Lemasson JJ, Gonzalez JP, Gallian P, Gritsun TS, Holmes EC, Gould EA, de Lamballerie X. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. Virology. 2007 Apr 25;361(1):80-92.

Gresikova M, Rehacek J. Isolation of the tick encephalitis virus from the blood and milk of domestic animals (sheep and cow) after infection by ticks of the family Ixodes ricinus. Arch Gesamte Virusforsch. 1959;9:360-4.

Gresikova M. Excretion of the tickborne encephalitis virus in the milk of subcutaneously infected cows. Acta Virol. 1958 Jul-Sep;2(3):188-92.

Gresíková M. Studies on tick-borne arboviruses isolated in Central Europe. Biol Prace (Bratislava) 1972;18(2):1-116.

Grinschgl G. Virus meningo-encephalitis in Austria. II. Clinical features, pathology, and diagnosis. *Bull World Health Organ.* 1955;12(4):535-64.

Gritsun TS, Desai A, Gould EA. The degree of attenuation of tick-borne encephalitis virus depends on the cumulative effects of point mutations. *J Gen Virol.* 2001 Jul;82(Pt 7):1667-75.

Gritsun TS, Frolova TV, Zhankov AI, Armesto M, Turner SL, Frolova MP, Pogodina VV, Lashkevich VA, Gould EA. Characterization of a siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis. *J Virol.* 2003 Jan;77(1):25-36.

Gritsun TS, Lashkevich VA, Gould EA. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res.* 2003 Jan;57(1-2):129-46.

Hayasaka D, Suzuki Y, Kariwa H, Ivanov L, Volkov V, Demenev V, Mizutani T, Gojobori T, Takashima I. Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis viruses from Japan and far-Eastern Russia. *J Gen Virol.* 1999 Dec;80 (Pt 12):3127-35.

Heinz FX, Mandl CW. The molecular biology of tick-borne encephalitis virus. *APMIS.* 1993 Oct;101(10):735-45.

Heinz FX, Stiasny K, Holzmann H, Grgic-Vitek M, Kriz B, Essl A, Kundi M. Vaccination and tick-borne encephalitis, central Europe. *Emerg Infect Dis.* 2013 Jan;19(1):69-76.

Heinze DM, Gould EA, Forrester NL. Revisiting the clinal concept of evolution and dispersal for the tick-borne flaviviruses by using phylogenetic and biogeographic analyses. *J Virol.* 2012 Aug;86(16):8663-71.

Holzmann H, Aberle SW, Stiasny K, Werner P, Mischak A, Zainer B, Netzer M, Koppi S, Bechter E, Heinz FX. Tick-borne encephalitis from eating goat cheese in a mountain region of Austria. *Emerg Infect Dis.* 2009 Oct;15(10):1671-3.

Holzmann H, Vorobyova MS, Ladyzhenskaya IP, Ferenczi E, Kundi M, Kunz C, Heinz FX. Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus: cross-protection between European and Far Eastern subtypes. *Vaccine*. 1992;10(5):345-9.

Hubálek Z, Juricová Z, Svobodová S, Halouzka J. A serologic survey for some bacterial and viral zoonoses in game animals in the Czech Republic. *J Wildl Dis*. 1993 Oct;29(4):604-7.

Hubálek Z, Pow I, Reid HW, Hussain MH. Antigenic similarity of central European encephalitis and louping-ill viruses. *Acta Virol*. 1995 Dec;39(5-6):251-6.

Hubálek Z, Rudolf I. Tick-borne viruses in Europe. *Parasitol Res*. 2012 Jul;111(1):9-36.

Hudopisk N, Korva M, Janet E, Simetinger M, Grgič-Vitek M, Gubenšek J, Natek V, Kraigher A, Strle F, Avšič-Županc T. Tick-borne encephalitis associated with consumption of raw goat milk, Slovenia, 2012. *Emerg Infect Dis*. 2013 May;19(5):806-8.

Jääskeläinen AE, Tonteri E, Sironen T, Pakarinen L, Vaheri A, Valpalahti O. European subtype tick-borne encephalitis virus in *Ixodes persulcatus* ticks. *Emerg Infect Dis*. 2011 Feb;17(2):323-5.

Jaenson TG, Hjertqvist M, Bergström T, Lundkvist A. Why is tick-borne encephalitis increasing? A review of the key factors causing the increasing incidence of human TBE in Sweden. *Parasit Vectors*. 2012 Aug 31;5:184.

Jellinger K. The histopathology of tick-borne encephalitis. In: Kunz C (ed) *Tick-borne encephalitis*. Facultas, Wien. 1979. pp 59-75.

Jemeršić L, Deždek D, Brnić D, Prpić J, Janicki Z, Keros T, Roić B, Slavica A, Terzić S, Konjević D, Beck R. Detection and genetic characterization of tick-

borne encephalitis virus (TBEV) derived from ticks removed from red foxes (*Vulpes vulpes*) and isolated from spleen samples of red deer (*Cervus elaphus*) in Croatia. Ticks Tick Borne Dis. 2013 Sep 10.

Kaiser R. Epidemiology and progress of early summer meningoencephalitis in Baden-Württemberg between 1994 and 1999. A prospective study of 731 patients. Dtsch Med Wochenschr. 2000 Sep 29;125(39):1147-53.

Kaiser R. The clinical and epidemiological profile of tick-borne encephalitis in southern Germany 1994-98: a prospective study of 656 patients. Brain. 1999 Nov;122 (Pt 11):2067-78.

Kaiser R. Tick-borne encephalitis in Southwestern Germany. Infection. 1996 Sep-Oct;24(5):398-99.

Khasnatinov MA, Danchinova GA, Kulakova NV, Tungalag K, Arbatskaia EV, Mironova LV, Tserennorov D, Bolormaa G, Otgonbaatar D, Zlobin VI. Genetic characteristics of the causative agent of tick-borne encephalitis in Mongolia. Vopr Virusol. 2010 May-Jun;55(3):27-32.

Kiermayr S, Kofler RM, Mandl CW, Messner P, Heinz FX. Isolation of capsid protein dimers from the tick-borne encephalitis flavivirus and in vitro assembly of capsid-like particles. J Virol. 2004 Aug;78(15):8078-84.

Kiffner C, Vor T, Hagedorn P, Niedrig M, Rühle F. Factors affecting patterns of tick parasitism on forest rodents in tick-borne encephalitis risk areas, Germany. Parasitol Res. 2011 Feb;108(2):323-35.

King AMQ, Adams MJ, Lefkowitz E, Carstens EB. Flaviviridae. In: Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ninth edition: 2012: 1003-1020.

Klaus C, Hoffmann B, Hering U, Mielke B, Sachse K, Beer M, Süss J. Tick-borne encephalitis (TBE) virus prevalence and virus genome characterization in field-collected ticks (*Ixodes ricinus*) from risk, non-risk and former risk areas of TBE, and in ticks removed from humans in Germany. Clin Microbiol Infect. 2010 Mar;16(3):238-44.

Klaus C, Hörügel U, Hoffmann B, Beer M. Tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection in horses: clinical and laboratory findings and epidemiological investigations. Vet Microbiol. 2013 May 3;163(3-4):368-72.

Knap N, Avšič-Županc T. Correlation of TBE incidence with red deer and roe deer abundance in Slovenia. PLoS One. 2012 Jun 11;8(6):e66380.

Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA. Flaviviridae. In: Fields' virology. Fifth edition: 2007: 1101-1152.

Kofler RM, Hoenninger VM, Thurner C, Mandl CW. Functional analysis of the tick-borne encephalitis virus cyclization elements indicates major differences between mosquito-borne and tick-borne flaviviruses. J Virol. 2006 Apr;80(8):4099-113.

Korenberg EI, Kovalevskii YV. Main features of tick-borne encephalitis eco-epidemiology in Russia. Zentralbl Bakteriol. 1999 Dec;289(5-7):525-39.

Korenberg EI, Pchelkina AA, Kovalevsky JV. Contact of birds with tick-borne encephalitis virus in the eastern part of the Russian plain. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol. 1984;28(1):65-72.

Környey S. Contribution to the histology of tick-borne encephalitis. Acta Neuropathol. 1978 Aug 7;43(1-2):179-83.

Kovalev SY, Chernykh DN, Kokorev VS, Snitkovskaya TE, Romanenko VV. Origin and distribution of tick-borne encephalitis virus strains of the Siberian subtype in the Middle Urals, the north-west of Russia and the Baltic countries. J

Gen Virol. 2009 Dec;90(Pt 12):2884-92.

Kozuch O, Gresíková M, Nosek J, Lichard M, Sekeyova M. The role of small rodents and hedgehogs in a natural focus of tick-borne encephalitis. Bull World Health Organ. 1967a;36 Suppl:61-6.

Kozuch O, Grulich I, Nosek J, Albrecht P. Isolation of tick-borne encephalitis virus from the blood of the mole (*Talpa europaea*) in a natural focus of infection. Acta Virol. 1966 Jan;10(1):84.

Kozuch O, Lichard M, Nosek J, Chmela J. Isolation of tick-borne encephalitis virus from the blood of *Sorex araneus* in a natural focus. Acta Virol. 1967b Nov;11(6):563.

Kritz G, Leschnik M, Leidinger E. *Ixodes ricinus*: Gemeingefährlich für Hunde! Kleintierpraxis. 2001;46:151-160.

Kunz C. Tick-borne encephalitis in Europe. Acta Leiden. 1992;60(2):1-14.

Kunze U. Is there a need for travel vaccination against tick-borne encephalitis? Travel Med Infect Dis. 2008 Nov;6(6):380-383.

Labuda M, Austyn JM, Zuffova E, Kozuch O, Fuchsberger N, Lysy J, Nuttal PA. Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. Virology. 1996 May 15;219(2):357-66.

Labuda M, Elecková E, Licková M, Sabó A. Tick-borne encephalitis virus foci in Slovakia. Int J Med Microbiol. 2002 Jun;291 Suppl 33:43-7.

Labuda M, Jones L, Williams T, Nuttal PA. Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts. Med Vet Entomol. 1993a Apr;7(2):193-6.

Labuda M, Jones LD, Williams T, Danielova V, Nuttal PA. Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between cofeeding ticks. *J Med Entomol.* 1993b Jan;30(1):295-9.

Labuda M, Randolph SE. Survival strategy of tick-borne encephalitis virus: cellular basis and environmental determinants. *Zentralbl Bakteriol.* 1999 Dec;289(5-7):513-24.

Lesnicar G, Poljak M, Seme K, Lesnicar J. Pediatric tick-borne encephalitis in 371 cases from an endemic region in Slovenia, 1959 to 2000. *Pediatr Infect Dis J.* 2003 Jul;22(7):612-7.

Libikova H. Epidemiology of neuroviral infections. *Lek Obz.* 1952;1(3-4):128-31.

Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res.* 2003;59:23-61.

Lindgren E, Talleklint L, Polfeldt T. Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease transmitting European tick *Ixodes ricinus*. *Environ Health Perspect.* 2000 Fe;108:119-23.

Lindhe KE, Meldgaard DS, Jensen PM, Houser GA, Berendt M. Prevalence of tick-borne encephalitis virus antibodies in dogs from Denmark. *Acta Vet Scand.* 2009 Dec 29;51:56.

Lindquist L, Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *Lancet.* 2008 May 31;371(9627):1861-71.

Luckschander N, Kölbl S, Enzesberger O, Zipko HT, Thalhammer JG. Frühsommermeningoenzephalitis- (FSME) Infektion in einer österreichischen Pferdepopulation. *Tierärztliche Praxis, Ausgabe Großtiere, Nutztiere.* 1999;27, 235-238.

Modrow S, Falke D, Truyen U. Flaviviren. In: Molekulare Virologie. 3. Auflage: 2010: 196-224.

Müller K, König M, Thiel HJ. Tick-borne encephalitis (TBE) with special emphasis on infection in horses. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 2006 Apr;113(4):147-51.

Müller W. Tick-borne encephalitis in dogs: serological-epidemiological investigations. Proceedings of the Fourth International Potsdam Symposium on Tick-borne diseases: Tick-borne encephalitis and lyme borreliosis. Berlin. 1997: p23.

Murphy FA. Togavirus Morphology and Morphogenesis. In: The Togaviruses: Biology, Structure, Replication. 1980: 241-316.

Nosek J, Rehacek J, Ernek E, Gresikova M. The importance of small vertebrates as reservoirs of tick encephalitis viruses in a natural focus in the area of Zlate Moravce. Cesk Epidemiol Mikrobiol Imunol. 1962 Nov;11:381-5.

Nuttal PA, Labuda M. Dynamics of infection in tick vectors and at the tick-host interface. Adv Virus Res. 2003;60:233-72.

Pazdiora P, Benesová J, Böhmová Z, Králíková J, Kubátová A, Menclová I, Morávková I, Průchová J, Prechová M, Spácilová M, Vodrážková Z, Struncová V, Svecová M. The prevalence of tick-borne encephalitis in the region of West Bohemia (Czech Republic) between 1960-2005. Wien Med Wochenschr. 2008;158(3-4):91-7.

Pfeffer M, Dobler G. Tick-borne encephalitis virus in dogs – is this an issue? Parasit Vectors. 2011 Apr 13;4:59.

Randolph SE, Miklisová D, Lysy J, Rogers DJ, Labuda M. Incidence from coincidence: patterns of tick infestations on rodents facilitate transmission of tick-borne encephalitis virus. Parasitology. 1999 Feb;118 (Pt 2):177-86.

Randolph SE. Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. *Parasitology* 2004;129 Suppl:S37-65.

Randolph SE. Transmission of tick-borne pathogens between co-feeding ticks: Milan Labuda's enduring paradigm. *Ticks Tick Borne Dis.* 2011 Dec;2(4):179-82.

Reháček J. Transovarial transmission of tick-borne encephalitis virus by ticks. *Acta Virol.* 1962 May;6:220-6.

Reiner B, Fischer A. Frühsommer-Meningoenzephalitis beim Hund in Deutschland: Zwei Fallberichte. *Kleintierpraxis.* 1998;42:255-269.

Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science.* 1985 Aug 23;229(4715):726-33.

Rieger MA, Nübling M, Müller W, Hasselhorn HM, Hofmann F. Foxes as indicators for TBE endemicity – a comparative serological investigation. *Zentralbl Bakteriologie* 1999;289:610-618.

Robert Koch-Institut. FSME: Risikogebiete in Deutschland (Stand: Mai 2013). *Epid Bull.* 2013;18:151-163.

Rouha H, Hoenninger VM, Thurner C, Mandl CW. Mutational analysis of three predicted 5'-proximal stem-loop structures in the genome of tick-borne encephalitis virus indicates different roles in RNA replication and translation. *Virology.* 2011 Aug 15;417(1):79-86.

Rushton JO, Lecollinet S, Hubálek Z, Svobodová P, Lussy H, Nowotny N. Tick-borne encephalitis virus in horses, Austria, 2011. *Emerg Infect Dis.* 2013 Apr;19(4):635-7.

Satz N. Identifizierung von Naturherden und deren Risiko. In: Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME). 1. Auflage: 2006: 89.

Skarphéðinsson S, Jensen PM, Kristiansen K. Survey of tickborne infections in Denmark. *Emerg Infect Dis*. 2005 Jul;11(7):1055-61.

Spitalská E, Literák I, Sparagano OA, Golovchenko M, Kocianová E. Ticks (Ixodidae) from passerine birds in the Carpathian region. *Wien. Klin. Wochenschr*. 2006 Dec;118(23-24): 759-764.

Strode GK. *Yellow Fever*. New York:McGraw-Hill; 1951.

Süss J, Klaus C, Diller R, Schrader C, Wohanka N, Abel U. TBE incidence versus virus prevalence and increased prevalence of the TBE virus in *Ixodes ricinus* removed from humans. *Int J Med Microbiol*. 2006 May;296 Suppl 40:63-8.

Süss J, Sinnecker H, Sinnecker R, Berndt D, Zilske E, Dedek G, Apitzsch L. Epidemiology and ecology of tick-borne encephalitis in the eastern part of Germany between 1960 and 1990 and studies on the dynamics of a natural focus of tick-borne encephalitis. *Zentralbl Bakteriol*. 1992 Jul;277(2):224-35.

Süss J. Epidemiologie der Frühsommer-Meningoenzephalitis in Ostdeutschland. *ImpfDialog*. 2004;1:13-17

Süss J. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine*. 2003 Apr 1;21 Suppl 1:S19-35.

Tipold A, Fatzer R, Holzmann H. Zentraleuropäische Zeckenencephalitis beim Hund. *Kleintierpraxis*. 1993;38:619-628.

Titenko AM, Bachum SV, Borisova TI, Andaev EI, Botvinkin AD, Rudnic BV, Kolunov JA. Antibodies to arboviruses in cattle as an indicator of virus activity. *Int J Med Microbiol* 2002;291 Suppl 33:178.

Tomazic J, Pikelj F, Schwartz B, Kunze M, Kraigher A, Matjasic M. The clinical features of tick-borne encephalitis in Slovenia. A study of 492 cases in 1994. *Antibiotika Monitor*. 1996 May 4;12:115-20.

Tonteri E, Jääskeläinen AE, Tikkakoski T, Voutilainen L, Niemimaa J, Henttonen H, Vaheri A, Vapalahti O. Tick-borne encephalitis virus in wild rodents in winter, Finland, 2008-2009. *Emerg Infect Dis*. 2011 Jan;17(1):72-5.

Van Tongeren HA. Encephalitis in Austria. IV. Excretion of virus by milk of the experimentally infected goat. *Arch Gesamte Virusforsch*. 1955;6(2-3):158-62.

Waldenström J, Lundkvist A, Falk KI, Garpmo U, Bergström S, Lindegren G, Sjöstedt A, Mejlon H, Fransson T, Haemig PD, Olsen B. Migrating Birds and Tickborne Encephalitis Virus. *Emerg Infect Dis*. 2007 Aug;13(8): 1215–8.

Walder G, Lkhamsuren E, Shagdar A, Bataa J, Batmunkh T, Orth D, Heinz FX, Danichova GA, Khasnatinov MA, Würzner R, Dierich MP. Serological evidence for tick-borne encephalitis, borreliosis, and human granulocytic anaplasmosis in Mongolia. *Int J Med Microbiol*. 2006 May;296 Suppl 40:69-75.

Waldvogel A, Matile H, Wegmann C, Wyler R, Kunz C. Tick-borne encephalitis in the horse. *Schweiz Arch Tierheilkd*. 1981 May;123(5):227-33.

Wallner G, Mandl CW, Ecker M, Holzmann H, Stiasny K, Kunz C, Heinz FX. Characterization and complete genome sequences of high- and low- virulence variants of tick-borne encephalitis virus. *J Gen Virol*. 1996 May;77(5):1035-42.

Wandeler A, Steck F, Fankhauser R, Kammermann B, Gresiková M, Blascovic D. Isolation of the virus of Central European tick-borne encephalitis in Switzerland. *Pathol Microbiol (Basel)*. 1972;38(4):258-70.

Weidmann M, Frey S, Freire CC, Essbauer S, Růžek D, Klempa B, Zubrikova D, Vögerl M, Pfeffer M, Hufert FT, Zanotto PM, Dobler G. Molecular phylogeography of tick-borne encephalitis virus in central Europe. *J Gen Virol*.

2013 Sep;94(Pt 9):2129-39.

Weissenböck H, Holzmann H. Immunhistologischer Nachweis von Frühsommer Meningoencephalitis beim Hund in Österreich. Wien Tierärztl Monatsschr. 1997;84:34-38.

Weissenböck H, Suchy A, Holzmann H. Tick-borne encephalitis in dogs: neuropathological findings and distribution of antigen. Acta Neuropathol. 1998 Apr;95(4):361-6.

Wengler G, Wengler G, Gross HJ. Studies on virus-specific nucleic acids synthesized in vertebrate and mosquito cells infected with flaviviruses. Virology. 1978 Sep;89(2):423-37.

Zanotto PM, Gao GF, Gritsun T, Marin MS, Jiang WR, Venugopal K, Reid HW, Gould EA. An arbovirus cline across the northern hemisphere. Virology. 1995 Jun 20;210(1):152-9.

Zanotto PM, Gould EA, Gao GF, Harvey PH, Holmes EC. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jan 23;93(2):548-53.

Zeman P, Januska J, Orolinova M, Stuen S, Struhar V, Jebavy L. High seroprevalence of granulocytic ehrlichiosis distinguishes sheep that were the source of an alimentary epidemic of tick-borne encephalitis. Wien Klin Wochenschr. 2004 Sep 30;116(17-18):614-6.

Zindl W, Wyler R. Zeckenzephalitis bei einer Ziege im Prättigau. Schweiz Arch Tierheilk. 1983;125:383-386.

VIII. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei den Betreuern meiner Doktorarbeit, Herrn Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter von der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München und Frau PD Dr. Sandra Eßbauer vom Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr für ihre Zeit und Unterstützung bei meiner Doktorarbeit bedanken.

Einen herzlichen Dank an meinen Abteilungsleiter Herrn PD Dr. Gerhard Dobler vom Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr für die Doktorandenstelle, die über das BMBF-Projekt „Arbovirusinfektionen in Deutschland“ 01K0712 finanziert wurde und für die Möglichkeit in seiner Abteilung Virologie & Rickettsiologie die Doktorarbeit durchzuführen. Dabei hat er mir immer sehr gerne mit Rat und Tat zur Vermehrung meines Wissens zur Seite gestanden und mich mit seinen kreativen Ideen zu jeder Zeit unterstützt. Nicht unerwähnt sollte bleiben, dass er meine Begeisterung für die Virologie geweckt und großes Vertrauen in meine Arbeit investiert hat.

Vielen Dank an Herrn Professor Dr. Zöller, Leiter des Instituts für Mikrobiologie der Bundeswehr für seine Unterstützung und die Möglichkeit, die Doktorarbeit an seinem Institut durchzuführen.

Danke auch an alle Mitarbeiter der Abteilung Virologie & Rickettsiologie des Instituts für Mikrobiologie der Bundeswehr für ihre Unterstützung bei der praktischen Durchführung meiner Versuche. Zum Gelingen meiner Laborarbeit haben ganz besonders Harald Weber, Gudrun Zöller, Mareike Pollaerts, Klaus Freimüller, Stephan Motzkus und Dr. Patrick Vollmar beigetragen, Vielen Dank!

Herzlichen Dank an meine ganze Familie, im besonderen Beate, Julius und Lisa, die mich während meines Studiums und meiner Doktorarbeit in jeder erdenklichen Art und Weise unterstützt haben. Euch sei diese Doktorarbeit gewidmet.